

09/254344

PCT/JP98/03037

日 本 国 特 許 庁

06.07.98

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1997年 7月 7日

REC'D 21 AUG 1998

WIPO

PCT

出 願 番 号
Application Number:

平成 9年特許願第180883号

出 願 人
Applicant(s):

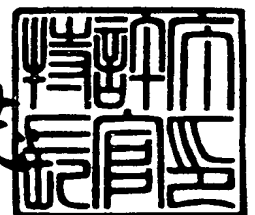
理化学研究所
株式会社ニッポンジーン

PRIORITY DOCUMENT

1998年 8月 7日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

山 建 志



出証番号 出証特平10-3062464

【書類名】 特許願

【整理番号】 97057H

【提出日】 平成 9年 7月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明の名称】 R N Aポリメラーゼ

【請求項の数】 20

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3丁目1番1 理化学研究所ライ
 フサイエンス筑波研究センター内

 【氏名】 林崎 良英

【発明者】

 【住所又は居所】 富山県中新川郡舟橋村上国重25-13

 【氏名】 綿引 正則

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

 【代表者】 有馬 朗人

【特許出願人】

 【識別番号】 000135162

 【氏名又は名称】 株式会社ニッポンジーン

 【代表者】 米田 祐康

【代理人】

 【識別番号】 100092635

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

 【識別番号】 100096219

 【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007663

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9607613

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 RNAポリメラーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 対応する野性型RNAポリメラーゼの能力と比較して、3デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させるように、少なくとも1つのアミノ酸が修飾された野性型RNAポリメラーゼからなることを特徴とするRNAポリメラーゼ。

【請求項2】 野性型RNAポリメラーゼのヌクレオチド結合部位中に存在する少なくとも1つのアミノ酸が修飾されている請求項1記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項3】 アミノ酸の修飾が、アミノ酸の変異、挿入または欠落である請求項2に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項4】 野性型RNAポリメラーゼのヌクレオチド結合部位中に存在する少なくとも1つのアミノ酸がチロシンに置換されている請求項1～3のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項5】 置換されたアミノ酸がフェニルアラニンである請求項4に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項6】 ヌクレオチド結合部位に存在するアミノ酸が、ヘリックスYとヘリックスZとの間のループ中のアミノ酸及び／又はヘリックスZとヘリックスAAとの間のループ中のアミノ酸である請求項2～5のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項7】 3デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体に対する取り込み能力を、野性型の少なくとも2倍増加させるように修飾されている請求項1～6のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項8】 T7ファージ、T3ファージ、SP6ファージ、K11ファージに由来する請求項1～7のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項9】 T7ファージ由来のRNAポリメラーゼのアミノ酸残基641-667に対応する領域から選択される領域中の少なくとも1つのアミノ酸が修飾されている野性型RNAポリメラーゼであることを特徴とするRNAポリメラーゼ。

【請求項10】 修飾されるべき野性型RNAポリメラーゼが、前記以外のアミノ酸の変異、挿入または欠落を、さらに有する請求項1～9のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項11】 T7ファージ由来のRNAポリメラーゼであって、アミノ酸残基644または667においてチロシンを有するRNAポリメラーゼ。

【請求項12】 T7ファージ由来のRNAポリメラーゼがアミノ酸残基644及び667以外のアミノ酸の変異、挿入または欠落をさらに有する請求項11に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項13】 T3ファージ由来のRNAポリメラーゼであって、アミノ酸残基645または668においてチロシンを有するRNAポリメラーゼ。

【請求項14】 T3ファージ由来のRNAポリメラーゼがアミノ酸残基645及び668以外のアミノ酸の変異、挿入または欠落をさらに有する請求項13に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項15】 K11ファージ由来のRNAポリメラーゼであって、アミノ酸残基664～669の間または690においてチロシンを有するRNAポリメラーゼ。

【請求項16】 K11ファージ由来のRNAポリメラーゼがアミノ酸残基664～669の間または690以外のアミノ酸の変異、挿入または欠落をさらに有する請求項15に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項17】 SP6ファージ由来のRNAポリメラーゼであって、アミノ酸残基633～638の間または670においてチロシンを有するRNAポリメラーゼ。

【請求項18】 SP6ファージ由来のRNAポリメラーゼがアミノ酸残基633～638の間または670以外のアミノ酸の変異、挿入または欠落をさらに有する請求項17に記載のRNAポリメラーゼ。

【請求項19】 請求項1～18のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド。

【請求項20】 請求項1～18のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼを製造する方法であって、

RNAポリメラーゼをコードする核酸分子を用意し、ヌクレオチド塩基配列内の1つまたはそれ以上の部位における1つまたはそれ以上の塩基を変更させるように該核酸分子に突然変異を起こさせ、次いで変異させた核酸分子により発現される修飾されたRNAポリメラーゼを回収することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNAの塩基配列決定法等に有用な変異型RNAポリメラーゼに関する。

【0002】

【従来の技術】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法は優れた方法であり、年々その利用範囲が広がっている[Randall K. Saiki et al. (1988) Science 239, 487-491]。PCR法では、1分子のDNA断片を増幅することも可能である。PCR法で増幅した生成物をクローニングすることなくシーケンスする方法(ダイレクト・シーケンス法)も有用な方法である[Corinne Wong et al. (1988) Nature, 330, 384-386]。この方法はライブラリー作製やそのライブラリーのスクリーニングが不要であり、多くのサンプルの配列情報を同時に得られる迅速な方法である。

【0003】

しかるに、上記ダイレクト・シーケンス法には2つの大きな問題点がある。

一つは、取り込めなかったプライマー及び2'デオキシリボヌクレオシド5'トリフォスフェート(2' dNTPs)が反応系中に残存し、これらがシーケンス反応を妨げることである。従って、従来法では、これら残存するプライマーと2' dNTPsは、シーケンスの前にPCR生成物から除去する必要があった。PCR生成物の精製方法には種々の方法があり、例えば、電気泳動による精製法、エタノール沈殿法、ゲル濾過法、HPLC精製法がある[例えば、Dorit R.L et al. (1991) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 11, John Wiley and Sons, New York, 15.2.1-15.2.11参照]。しかし、何れの方法でも煩

雑である。

【0004】

2つ目の問題は、PCR 生成物の迅速な再生 (renaturation) である。PCR 生成物が2本鎖DNAに再生してしまうと、1本鎖のテンプレート（鋳型）ではなくなり、プライマーと1本鎖テンプレートとの間のアニーリングを妨げる。再生を最小限にするための方法として、例えば変性後の急冷、1つのプライマーのビオチレーション (biotilation) とストレプトアビジン被覆物へのPCR生成物の吸着、エクソヌクレアーゼの使用、アシンメトリックPCR等が報告されている。例えば、Barbara Bachmannら、1990, Nucleic Acid Res., 18, 1309- に開示されている。しかし、これらの方法の殆どは、長い時間を必要とし、非常に面倒である。

【0005】

そこでそれらを解決するための新しい方法として、本発明者は、PCR 反応系中に残存する未反応のプライマー及び2' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート (2' dNTPs) を除去することなく、かつPCR反応生成物が迅速に再生する問題を回避するため、変性自体を全く行わないで良い、全く新しいDNAの塩基配列決定方法を提案した [W096/14434]。この方法は、T7 RNAポリメラーゼ等のRNAポリメラーゼとRNA転写反応のターミネーター（例えば、3' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート、3' dNTPs) を用いるダイレクト転写シーケンス法である。この方法によれば、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅したDNA生成物の塩基配列を、プライマー及び2' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート (2' dNTPs) を除去する必要なしにそのままシーケンスに使用できる。さらに、変性自体を全く行わないため、PCR生成物が迅速に再生する問題も回避でき、極めて優れた方法である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

ところが、上記方法について本発明者がさらに研究を行ったところ、より正確な塩基配列データを得るためには、さらに解決すべき課題があることを見出した。

上記塩基配列決定法において、T7 RNAポリメラーゼ等の RNAポリメラーゼは、ATP、GTP、CTP 及びUTP 又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5' トリフォスフェート類並びに3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP或いはそれらの誘導体からなる少なくとも1種の3' デオキシリボヌクレオチドの混合物中で反応させる。この反応において、鋳型の配列に相応した塩基を有するリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドが、リボヌクレオチド配列中に逐次取り込まれることで、ポリリボヌクレオチドが合成される。

【0007】

ところが、リボヌクレオチドに比べて、対応する3-デオキシリボヌクレオチドやその誘導体は、上記配列に取り込まれにくいこと、さらに、リボヌクレオチドの中及び3-デオキシリボヌクレオチドの中でもそれぞれ塩基の種類により、配列への取り込まれ方に差があることが判明した。このようにリボヌクレオチドと3-デオキシリボヌクレオチドとの間、並びに異なる塩基を有するリボヌクレオチド間及び異なる塩基を有するデオキシリボヌクレオチド間でのバイアスが存在するため、転写生成物は得られるものの、得られる転写生成物は短鎖であったり、標識されたりリボヌクレオチドからのシグナルにバラツキがあったりして、正確なシーケンスデータを得ることは難しかった。

【0008】

そこで、本発明の目的は、この取り込み能力に対してヌクレオチドの種類によるバイアスが少ないか、或いは全くないRNA ポリメラーゼを提供することにある。

【0009】

尚、本発明の説明中において、アミノ酸残基は、慣例により使用されている一文字表記法を用いる。本文中に出てくるアミノ酸のみ、理解のために記述すると、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、プロリン(P)、ロイシン(L)、ヒスチジン(H)である。また、ポリメラーゼ蛋白質のN末端からの番号を記し、例えばF667というように表す。これは、このポリメラーゼの667番目のアミノ酸残基がFであることを示し、F667Yの記述は、667番目のアミノ酸残基FをYに置換させたことを意味する。

【0010】

ところで、DNA ポリメラーゼについても、ヌクレオチドの種類により取り込みに差異があることが知られており、さらにこのような取り込みの差異を解消した変異型のDNA ポリメラーゼが知られている〔特開平8-205874号、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6339-6345, 1995〕。

【0011】

そこには、T7 DNAポリメラーゼを用いたシーケンス反応におけるヌクレオチドの取り込みに対する均一性は、このポリメラーゼ中の526番目のアミノ酸が生み出しているということが記載されている。さらに、この酵素とその他のDNAポリメラーゼのアミノ酸配列の相同性に基づいて、他のDNAポリメラーゼの相同部位のアミノ酸を変えることにより、取り込みのバイアスが低下すると記載されている。即ち、T7 DNAポリメラーゼのY(チロシン)526が、2-dNTPと2,3-ddNTPの取り込み効率のバイアスが少ない原因である。更に、大腸菌DNAポリメラーゼIのF(フェニルアラニン)762、及び*Thermus aquaticus* DNAポリメラーゼ (Taq DNA ポリメラーゼと一般には呼ばれている) のF(フェニルアラニン)667が、T7 DNAポリメラーゼのY526の相同なアミノ酸残基であり、このアミノ酸残基を各々、F762Y(チロシン)およびF667Y(チロシン)に変化させることで取り込みバイアスが低下すると記載している。

【0012】

さらに、このようなDNAポリメラーゼに関するデータに基づいて、T7 RNAポリメラーゼについても、DNAポリメラーゼで議論されている領域と相同な領域、即ち残基631-640に対する修飾はdNTPに対するその特異性を変化させるであろうことを示唆している、と記載している。

しかるに、RNA ポリメラーゼについては、これまでシーケンス法に使用されることはなく、リボヌクレオチドの取り込みに差異があること自体問題にならなかった。さらに、このような状況下、当然のことながら、取り込みの差異を解消した変異型のRNA ポリメラーゼは知られていなかった。事実、上記特開平8-205874号公報には、T7 RNAポリメラーゼを修飾した実例は記載されていない。

【0013】

さらに、T7RNAポリメラーゼのこの領域は、Protein Engineering, 3:461-467, 1990に示されているモチーフB中の、DNAポリメラーゼの α 型、I型及びDNA依存性RNAポリメラーゼ（T7RNAポリメラーゼはこの中に分類される）に特に保存されたアミノ酸KとYGに挟まれた9～10アミノ酸残基からなる領域に相当すると考えられる。先にDNAポリメラーゼで議論された大腸菌DNAポリメラーゼのアミノ酸残基762あるいはTaqDNAポリメラーゼのアミノ酸残基667のF（フェニルアラニン）は、I型に分類されているDNAポリメラーゼの多くに観察される。しかるに、驚いたことに、DNAポリメラーゼと極めて相同性が高いにも係わらず、T7RNAポリメラーゼでは、上記領域に相当する残基631-640にはF（フェニルアラニン）は存在せず、上記公報の示唆をそのまま実行することはできないことが判明した。

【0014】

加えて、本発明者は、大腸菌DNAポリメラーゼIのF762の位置は、フィンガー・サブドメインのヘリックス0に存在し、T7RNAポリメラーゼにおいて、この領域に相当する領域におけるアミノ酸の修飾を検討した。ところがSousa et al.の文献(Nature, 364:593-599, 1993)で示された立体構造上からの、大腸菌DNAポリメラーゼIのヘリックス0に相当するT7RNAポリメラーゼ中のヘリックスZにもF（フェニルアラニン）がなかった。

【0015】

このような状況下、本発明者は、この取り込み能力に対してリボヌクレオチド及び3-デオキシリボヌクレオチドの種類によるバイアスが少ないか、或いは全くないRNAポリメラーゼを提供することを目的として、新たなRNAポリメラーゼを独自に探索した。その結果、野性型RNAポリメラーゼのアミノ酸の一部を修飾することで、3デオキシリボヌクレオチドまたはその誘導体を取り込む能力を増加させたRNAポリメラーゼを見いだして本発明を完成した。

【0016】

尚、後述の説明から明らかになるが、本発明のRNAポリメラーゼ、特にそのアミノ酸修飾位置は、上記特開平8-205874号には全く示唆も教示もされていない

部位であり、今回、全く新らたに見いだされたものである。

【0017】

【課題を解決するための手段】

本発明は、対応する野性型RNAポリメラーゼの能力と比較して、3デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させるように、少なくとも1つのアミノ酸が修飾された野性型RNAポリメラーゼからなることを特徴とするRNAポリメラーゼに関する。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明において、「野性型RNAポリメラーゼ」とは、天然に存在する全てのRNAポリメラーゼを意味する。さらに、「野性型RNAポリメラーゼ」は、野性型RNAポリメラーゼであって、対応する野性型RNAポリメラーゼの能力と比較して、3デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させることを目的とする修飾以外のアミノ酸の変異、挿入または欠落を、さらに有するものであることもできる。即ち、野性型RNAポリメラーゼを人為的に上記以外の目的で修飾したRNAポリメラーゼも、上記「野性型RNAポリメラーゼ」に含まれる。但し、そのようなアミノ酸の変異、挿入または欠落は、RNAポリメラーゼとしての活性を維持する範囲で、行われたものであることが適当である。

【0019】

「野性型RNAポリメラーゼ」としては、例えば、T7ファージ、T3ファージ、SP6ファージ、K11ファージに由来するRNAポリメラーゼを挙げることができる。但し、これらのRNAポリメラーゼに限定されるものではない。

また、本発明において「野性型RNAポリメラーゼ」は、天然に存在する耐熱性のRNAポリメラーゼ、及び天然に存在するRNAポリメラーゼを耐熱性を有するように人為的に修飾した（即ち、アミノ酸の変異、挿入または欠落を行った）ものも包含する。但し、耐熱性を付与するための修飾は、RNAポリメラーゼとしての活性を維持する範囲で、行われたものであることが適当である。「野性型RNAポリメラーゼ」として耐熱性のRNAポリメラーゼを用いた本発明の変

異型RNAポリメラーゼも耐熱性となる。その結果、例えば、PCR法に併用して、PCR産物を鋳型としてその場で、即ち、PCRと並行して、シーケンス用のRNAフラグメントを合成することも可能である。

【0020】

T7 RNAポリメラーゼは、極めて特異性の高いプロモーター特異的RNAポリメラーゼとして知られている。T7 RNAポリメラーゼの塩基配列と生産法に関してはDavuloo et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 81:2035-2039 (1984)に記載されている。さらに大量生産に関しては、Zawadzki et al., Nucl. Acids Res., 19:1948(1991)に既に記載されている。このファージ由来のRNAポリメラーゼは、大腸菌や高等な生物のRNAポリメラーゼと異なり、単一のポリペプチドのみで転写反応を行うことが出来る(Chamberlin et al., Nature, 228:227-231,1970)。そのため、転写メカニズムを解析する格好の材料となり、沢山の突然変異体が分離され、報告されている。さらにSousa et al., Nature, 364:593-599,1993に結晶解析結果が記載されている。

【0021】

さらに、その他極めて特異性の高いプロモーター特異的RNAポリメラーゼとして大腸菌に感染するT3ファージ、サルモネラ菌に感染するSP6ファージ及び*Klebsiella pneumoniae*に感染するK11ファージ由来のRNAポリメラーゼの3つがよく知られている。

尚、上記4種のRNAポリメラーゼは、後述するように、アミノ酸の一次構造、プロモーターの配列等、極めて類似している。

【0022】

本発明のRNAポリメラーゼは、対応する野性型RNAポリメラーゼの能力と比較して、3デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させたものである。前述のように、野性型RNAポリメラーゼでは、リボヌクレオチドに比べて3デオキシリボヌクレオチドの取り込みが悪く、塩基配列決定法に用いる妨げとなっていた。それに対して、本発明のRNAポリメラーゼは、3デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体に対する取り込み能力を、好ましくは野性型の少なくとも2倍増加させるように修飾されている。3デオキ

シリボヌクレオチドの取り込みは、3デオキシシリボヌクレオチドに蛍光標識を付した3デオキシシリボヌクレオチド誘導体を用いた場合に特に低下する傾向があるが、本発明のRNAポリメラーゼは、このような3デオキシシリボヌクレオチド誘導体の取り込みも改善できる。

尚、ここで、リボヌクレオチドとは、ATP、GTP、CTP及びUTP又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5' トリフォスフェート類を意味し、3デオキシリボヌクレオチドは、3' dATP、3' dGTP、3' dCTP及び3' dUTPを意味し、その誘導体は、これら3デオキシリボヌクレオチドに例えば、蛍光標識を付した化合物を意味する。

【0023】

本発明のRNAポリメラーゼは、対応する野性型RNAポリメラーゼの少なくとも1つのアミノ酸が修飾されたものである。この点について以下に詳細に説明する。

【0024】

本発明者は、前述のようなT7 RNAポリメラーゼに関する種々の報告を踏まえた上で、T7 RNAポリメラーゼにおけるリボヌクレオチド等の種類により取り込み効率にバイアスが少ない或いは全くないRNAポリメラーゼ変異体を構築することを検討した。特に、野性型RNAポリメラーゼ上のどのアミノ酸を変異させるのか、さらに、変異として置換を行う場合、どのようなアミノ酸に置換させればよいかについて実際に、種々の変異体を作成して検討し、野性型RNAポリメラーゼの少なくとも1つのアミノ酸を修飾することで3デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を改善することができることを見出して、本発明の変異型RNAポリメラーゼを完成した。

【0025】

本発明者は、まず、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を挿入した発現プラスミドpT7Rを構築し、次に、この発現プラスミドpT7RをベースにしてT7 RNAポリメラーゼの変異体を構築した。即ち、T7 RNAポリメラーゼのF（フェニルアラニン）残基をY（チロシン）残基に変化させた変異型T7 RNAポリメラーゼであるF644Y、F646Y、F667Y、F733Y、F782Y、F882Yを構築し、これらの変異体について取り込み能

力の比較を行った。

【0026】

本明細書において、野性型T7 RNAポリメラーゼのアミノ酸配列は、遺伝子配列データベースであるGeneBankより、accession No. V01148 J02518 X00411のT7ファージDNA配列(39,937塩基対)の塩基番号3171-5822にコードされている配列(図1及び2参照)を基礎としている。図1及び2に示す配列の上段は、塩基配列、下段はその配列に対応するアミノ酸配列である。右端の数字は、塩基配列の場合、GeneBankに登録されているT7ファージゲノム(Locus T7CG, 39,937塩基対)の番号を示し、アミノ酸の番号は、T7 RNAポリメラーゼき最初のM(メチオニン)を1として、全長883アミノ酸残基からなっていることを示す。

尚、このアミノ酸配列は、上記Moffatt et al., J.Mol.Biol., 173(2):265-269, 1984に報告されているアミノ酸配列と同一である。

【0027】

従って、本明細書における野性型T7 RNAポリメラーゼ遺伝子のアミノ酸配列及び各アミノ酸に付された番号は、この図1及び2に示される配列及び番号である。さらに、前述のように、上記野性型T7 RNAポリメラーゼは、本発明で目的とする修飾以外のアミノ酸の変異、挿入または欠落を、さらに有するものであることもできる。従って、本発明の目的に基づいて変異を導入すべき野性型RNAポリメラーゼが、野性型T7 RNAポリメラーゼに別の変異を導入したものである場合、特に、そのような変異が、アミノ酸の挿入または欠落である場合、そのような挿入または欠落に応じて、上記アミノ酸番号は変動し、アミノ酸番号が図1及び2に示す番号とは異なったとしても、T7 RNAポリメラーゼ活性を維持している限り、そのような挿入または欠落を有するT7 RNAポリメラーゼも本発明において本発明の目的とする変異を導入する野生型T7 RNAポリメラーゼの範疇に含まれる。

【0028】

T7 RNAポリメラーゼ以外のRNAポリメラーゼについてのアミノ酸配列の番号は、図3及び4に示す配列表に基づき決定される。さらに、本発明で目的とする修飾以外のアミノ酸の変異、挿入または欠落を、さらに有するものであることもできる。従って、これらのアミノ酸配列及びその番号に付いても、T7 RNAポリメラー

ぜの場合と同様であり、アミノ酸の挿入または欠落による変異がある場合、そのような挿入または欠落に応じて、上記アミノ酸番号は変動するが、そのような一部に変異を有する野性型のRNAポリメラーゼも本発明において本発明の目的とする変異を導入する野生型T7 RNAポリメラーゼの範疇に含まれる。

【0029】

T7 RNAポリメラーゼ遺伝子は、T7ファージDNAを精製後、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子のN末端アミノ酸領域上流に特異的なプライマー(T7Rpol-N : 5'-ATA TTT TAG CCA TGG AGG ATT GAT ATA TGA ACA CGA TTA ACA TCG CTA AG -3')、及びC末端アミノ酸領域下流に特異的なプライマー(T7Rpol-C : 5'-ATA TTT TAG CCA TGG TAT AGT GAG TCG TAT TGA TTT GGC G -3')を合成し、PCRを用いて増幅、発現ベクターpT7Rを構築することができる(実施例1参照)。この発現ベクターを用い、大腸菌DH5 α に形質転換し、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加すると、T7 RNAポリメラーゼ蛋白質を大量に発現する。

【0030】

このT7 RNAポリメラーゼ遺伝子の配列を、図1及び2に示すアミノ酸配列と比較したところ、両者完全に一致した。尚、図1及び2に示すアミノ酸配列とGrachev et al., Bioorg. Kim., 10:824-843, 1984に報告されているアミノ酸配列とは、図1及び2に示すアミノ酸配列における623番目のY及び665番目のLが、Grachev et al.の報告におけるアミノ酸配列では、それぞれH(623番目)及びP(665番目)である点で相違していた。上述のように、本発明の変異型RNAポリメラーゼのベースとなる野性型RNAポリメラーゼは、図1及び2に示す配列に対して、本発明で目的とする修飾以外のアミノ酸の変異、挿入または欠落を、さらに有するものであることもでき、上記Grachev et al.の報告している623番目及び665番目の残基がそれぞれH及びPであるアミノ酸配列も、本発明の変異型RNAポリメラーゼのベースとなる野性型RNAポリメラーゼに含まれる。

【0031】

発現ベクターpT7Rを持つ大腸菌から精製したT7 RNAポリメラーゼは、イン・ビトロでT7プロモーターを含んだDNA存在下で十分なRNA合成活性を有していた。この発現プラスミドpT7Rをベースにして変異型T7 RNAポリメラーゼとして、前述のF6

44Y, F646Y, F667Y, F733Y, F782Y, F882Yを構築し、これらの変異体について取り込み能力の比較を行った。

【0032】

尚、F667Y変異を持つ、変異型T7 RNAポリメラーゼは、F667に対する変異以外に、F667の近傍のL665を前述のGrachev et al.の報告に従ってPとする変異も導入した。即ち、L665P/F667Yとして変異を導入した。

変異を導入したT7 RNAポリメラーゼを精製し、プロモーター配列特異的なRNA合成とATP、GTP、CTP及びUTP又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5'トリフォスフェート類並びに3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP或いはそれらの誘導体の取り込み能力を野生型T7 RNAポリメラーゼと比較した。

【0033】

その結果、F644Y、及びL665P/F667Yは、RNA合成活性を充分維持し、3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP或いはそれらの誘導体の取り込みの改善が見られた。F733Yは、RNA合成活性の若干の低下と、3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP或いはそれらの誘導体の取り込みの若干の改善が見られた。F646Y及びF782Yは、RNA合成活性を保持していたものの3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP或いはそれらの誘導体の取り込み能力の改善は見られなかった。F882Yは、RNA合成活性が著しく低下していた。

【0034】

以上の結果に基づいて、本発明のRNAポリメラーゼは、特に、ポリメラーゼの「ヌクレオチド結合部位」中に存在する少なくとも1つのアミノ酸が修飾されたRNAポリメラーゼであり、このような修飾により、対応するリボヌクレオチドに対して3デオキシリボヌクレオチドまたは他のリボヌクレオチド類似体を取り込む能力を増加させることができる。

【0035】

また、上記「ヌクレオチド結合部位」に存在するアミノ酸は、例えば、野生型RNAポリメラーゼのヘリックスYとヘリックスZとの間のループ中のアミノ酸及び／又はヘリックスZとヘリックスAAとの間のループ中のアミノ酸であることができる。

Sousa et al.の文献(Nature, 364:593-599,1993)に示されている立体構造から、鋳型DNAを包み込むポリメラーゼ分子中のクラフトの内側に面する、ヘリックスY (T7 RNAポリメラーゼのアミノ酸残基625から634に相当)とヘリックスZ (同アミノ酸残基649から658に相当)に挟まれたループ (同アミノ酸残基635から647に相当)及びヘリックスZとヘリックスAA (同アミノ酸残基685から699に相当)に挟まれたループ (同アミノ酸残基659から684に相当)は、極めてヌクレオチドに近いところに位置するリボヌクレオチド結合部位の一部であると考えられる。本発明では、実際に、このループに相当する領域の644、646、667に存在するF残基をY残基に置換した (図5参照)。

また、733、782及び882のF残基は、ループに相当する領域以外の領域に存在し、ポリメラーゼ分子中のクラフトの内側に面すると考えられる。これらのF残基についても実際にY残基に置換した。

【0036】

さらに本発明は、T7ファージ由来のRNAポリメラーゼのアミノ酸残基641-667に対応する領域から選択される領域中のアミノ酸において修飾されているRNAポリメラーゼに関する。T7ファージ由来のRNAポリメラーゼのアミノ酸残基641-667に対応する領域は、前述の「ヌクレオチド結合部位」に相当する。

【0037】

前記4種のRNAポリメラーゼは、アミノ酸の一次構造、プロモーターの配列等、極めて類似している。図3及び4に、上記4つのファージ由来のRNAポリメラーゼのアミノ酸配列を比較して示す。この比較より、T7、T3、K11由来のRNAポリメラーゼは、極めて類似していることが分かる。特に、図6及び7に示すように、T7とT3ファージ由来のRNAポリメラーゼのアミノ酸配列は、極めて類似性が高い。T7とT3ファージは、共に大腸菌に感染するファージであり、その性質も極めて類似していることと符合する。更にこの2つのRNAポリメラーゼの認識するプロモーター配列も類似しているが、その認識特異性は極めて高いことが知られている。このようにT7 RNAポリメラーゼにおいて得られた結果を、アミノ酸配列の類似する他のRNAポリメラーゼに適応することは比較的容易にできる。

【0038】

このような高い相同性から、T7ファージ由来のRNAポリメラーゼ以外のRNAポリメラーゼにおける、T7ファージ由来のRNAポリメラーゼのアミノ酸残基641-667に対応する領域は、T3ファージ由来のRNAポリメラーゼについては、アミノ酸残基642-668であり、K11ファージ由来のRNAポリメラーゼについては、アミノ酸残基664-690であり、SP6ファージ由来のRNAポリメラーゼについては、アミノ酸残基633-670である、と言える。前述のように、T7、T3、K11由来のRNAポリメラーゼは、極めて類似しており、T7 RNAポリメラーゼについての結果を、アミノ酸配列の類似する他の由来RNAポリメラーゼに適用することができる(図8参照)。

【0039】

上記RNAポリメラーゼとしては、例えば、T7ファージ由来のRNAポリメラーゼであって、アミノ酸残基644または667においてチロシンを有するRNAポリメラーゼを挙げることができる。また、T3ファージ由来のRNAポリメラーゼであって、アミノ酸残基645または668においてチロシンを有するRNAポリメラーゼを例示することもできる。さらに、K11ファージ由来のRNAポリメラーゼであってアミノ酸残基664~669の間または690においてチロシンを有するRNAポリメラーゼを例示することもできる。さらにまた、さらに、SP6ファージ由来のRNAポリメラーゼであってアミノ酸残基633~638の間または670においてチロシンを有するRNAポリメラーゼを例示することもできる。

【0040】

このようなアミノ酸の修飾は、アミノ酸の変異のみならず、挿入または欠落であることができる。また、アミノ酸の変異は、例えば、天然に存在するアミノ酸の少なくとも1つをチロシンに置換することである。さらに、置換されるべき天然に存在するアミノ酸は、例えば、フェニルアラニンであることができる。但し、フェニルアラニンに限定されることはなく、対応するリボヌクレオチドに対して3デオキシリボヌクレオチドまたは他のリボヌクレオチド類似体を取り込む能力を増加させることができるアミノ酸の置換であればよい。

【0041】

本発明の変異型RNAポリメラーゼにおいて、変異型T7 RNAポリメラーゼF644Y及びL665P/F667Yは、RNA合成活性を充分保持し、さらに3' dNTPsの取り込み能力が大幅に改善し、野生型で観察された強いバイアスが著しく低下していた。このような優れた特性を有する、変異型T7 RNAポリメラーゼF644Y、L665P/F667Yを用いることにより、DNAポリメラーゼを用いる塩基配列決定法を超える実用レベルで、転写生成物による塩基配列決定法が可能になる。

変異型T7 RNAポリメラーゼF644Y、L665P/F667Yを生産する大腸菌 pT7RF644Y(DH5 α)及びpT7RL665P/F667Y(DH5 α)は、生命研国際寄託番号がそれぞれ5998号(FERM-BP-5998)及び5999号(FERM-BP-5999)として1997年7月2日に寄託済みである。

【0042】

本発明は、上記本発明のRNAポリメラーゼを製造する方法であって、RNAポリメラーゼをコードする核酸分子を用意し、ヌクレオチド塩基配列内の1つまたはそれ以上の部位における1つまたはそれ以上の塩基を変異させるように該核酸分子に突然変異を起こさせ、次いで変異させた核酸分子により発現される修飾されたRNAポリメラーゼを回収することを含む方法を包含する。RNAポリメラーゼをコードする核酸分子の用意、核酸分子への突然変異の導入、修飾されたRNAポリメラーゼの回収はいずれも、公知の手法を用いて行うことができる。

【0043】

変異型T7 RNAポリメラーゼは、例えば、以下の方法により構築することができる。T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を挿入してある発現ベクターを鋳型にして T7 RNAポリメラーゼ遺伝子のC末端側に相当する制限酵素Hpa I, Nco I部位には含まれる領域をPCR法を利用して変異を導入した発現プラスミドを構築する。次いで、この発現プラスミドを用い、大腸菌DH5 α に形質転換し、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加すると、変異型T7 RNAポリメラーゼ蛋白質を大量に発現させることができる。

【0044】

【発明の効果】

本発明によれば、リボヌクレオチドに比べて、対応する3-デオキシリボヌクレ

オチドやその誘導体がポリリボヌクレオチド配列に取り込まれにくかったり、リボヌクレオチドの中及び3-デオキシリボヌクレオチドの中でもそれぞれ塩基の種類により、配列への取り込まれ方に差があるといった、リボヌクレオチド等の取り込み能力に対するバイアスが少ないか、或いは全くないRNAポリメラーゼを提供することができる。

さらに、本発明のRNAポリメラーゼを用いることで、煩雑な操作もなく、DNAポリメラーゼを用いる塩基配列決定法以上の塩基配列決定を可能にする。

また、耐熱性を有する本発明のRNAポリメラーゼは、例えば、W096/14434に開示されたDNAの塩基配列決定方法において、PCR法に併用することで、より迅速にDNAの塩基配列の決定を行うことが可能になる。

【0045】

【実施例】

以下実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

実施例 1

野生型T7 RNAポリメラーゼ遺伝子のクローニングと発現プラスミドの構築

大腸菌を宿主とするT7ファージは、以下のように精製した。大腸菌C600をLB培地 (Bacto tryptone 10g, Bacto yeast extract 5g, NaCl 5gを1リッターの水に溶かし、pH 7.5に調整したのち、オートクレーブにて滅菌した培地) 200mlに植菌し、菌体濃度がOD (600nm) =1.0に達した時点で、多重感染度約2で感染させ、その後ODを経時的に測定し、ODが急激に落ちた時点で遠心操作にて、菌体残査をのぞき、NaCl及びポリエチレングリコール6000をそれぞれ最終濃度、0.5M、及び10%になるように加え、よく攪拌後、一晚、4℃にて静置し、沈殿を形成させた。この沈殿を遠心操作で集め、SM緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgSO₄, 50 mM NaCl, 0.01% gelatin) にて懸濁した。このT7ファージの濃縮液を、次に遠心管に丁寧に重層した密度の異なるCsCl溶液上 (下層から、CsCl濃度が、1.267g/ml, 0.817g/ml, 0.705g/mlである溶液) に重層し、22,000rpmで2時間、遠心することにより、ファージ層を形成させ、このファージの白いバンドを丁寧に分取し、TE緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA) で透析し、CsCl成分を除去した。更にこのファージ溶液を、フェノール処理により、ファージ蛋白質を

変性させ、T7ファージのゲノムDNAを精製した。

【0046】

T7 RNAポリメラーゼ遺伝子はこのゲノムDNA、39,937塩基対の内、3171から5822番目にコードされている[T7ゲノム遺伝子の全塩基配列については、Dunnらによって既に報告されている(1983, J. Mol. Biol., 166(4):477-535)。但し、若干の訂正がある(GeneBank、accession No. V01148 J02518 X00411のT7ファージDNA配列参照)]。このゲノムDNAを鋳型としてPCRを利用して増幅し、以下のように発現ベクターにクローニングした(図9参照)。すなわち、5'末端に制限酵素 Nco I 切断部位をそれぞれ含み、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子の N末端アミノ酸領域上流に特異的なプライマー(T7Rpol-N 5'-ATA TTT TAG CCA TGG AGG ATT GAT ATA TGA ACA CGA TTA ACA TCG CTA AG -3')、及び C末端アミノ酸領域下流に特異的なプライマー(T7Rpol-C 5'-ATA TTT TAG CCA TGG TAT AGT GAG TCG TAT TGA TTT GCG -3')を用いて、この酵素遺伝子を PCR法により増幅した。この DNAフラグメントを Nco I で消化し、1%アガロース電気泳動を行い、目的のDNAフラグメントをアガロースから切り出し、Gene Pure Kit(ニッポンジーン)を用いて精製した。これをNco Iで消化し脱リン酸化した発現ベクター pTrc99a(ファルマシア・バイオテック)と連結することで T7 RNA ポリメラーゼを高発現する pT7R を構築した。野生型T7 RNAポリメラーゼを発現するプラスミドpT7Rは、大腸菌DH5 α に形質転換し、抗生物質アンピシリン耐性を示す大腸菌を、培養し、培養液中にIPTGを添加し、発現ベクターpT7Rに含まれるTrc プロモーターを稼働させた。IPTG添加2時間後、大腸菌を回収し、全蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析したところ、T7 RNAポリメラーゼの分子量である99kDa付近に、IPTGを添加した時のみ蛋白質のバンドが検出された。この蛋白質を更に、Zawadzki, Vら、1991, Nucl. Acids Res., 19:1948 に既に記載されている方法を一部改良した方法(詳しい方法は実施例3で例示されている変異型T7 RNAポリメラーゼの精製法とほとんど同じ方法で行うことが出来る)で精製したところ、T7プロモーター特異的に作用するRNAポリメラーゼの活性を有していた。

【0047】

実施例2

変異型T7 RNAポリメラーゼを生産するための発現プラスミドの構築

(1)変異型T7 RNAポリメラーゼF644Yを生産するための発現プラスミドの構築
(図10参照)

野生型T7 RNAポリメラーゼ遺伝子の挿入してある pT7R を鋳型にして、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子のC末端側に相当する制限酵素 Hpa I , Nco I 部位に挟まれる領域を PCR法を利用して変異を導入した。更に詳しく例示すると、変異を導入したい塩基を境界として、左右に分け、変異の導入してあるプライマーF646Y(+) (5'-GTT GAC GG A AGC CGT ACT CTT TGG AC-3'), F646Y(-) (5'-GTC CAA AGA GTA CGG CTT CCG TCA AC-3')とそれぞれの制限酵素切断部位を5'末端に持つプライマーT7RNAP-HpaI-N (5'-CGC GCG GTT AAC TTG CTT CCT AG -3'), pTrc99a-PstI-C (5'-GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AG -3')を用いて PCRによりそれぞれの DNAフラグメントを増幅した。これらの DNAフラグメントには相補する部分があり、これらを変性、アニール、伸長反応を繰り返すことで目的の変異の導入された DNAフラグメントを作製した。この DNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動により、目的の大きさの DNAフラグメントのみを切り出すことで精製し、これを鋳型としてプライマーT7RNAP-HpaI-NとpTrc99a-PstI-Cを用いて再増幅し、制限酵素Hpa I , Pst I で切断した。このDNAは1%アガロース電気泳動を行い、分離した後、目的のDNAフラグメントを切り出し、精製した。この DNAフラグメントを pT7R のHpa I , Pst I DNAフラグメントと置き換えることで変異を導入し、大腸菌DH5 α に形質転換し、変異の導入されたプラスミドを選択し、最終的には塩基配列を確認することで目的の位置に変異が導入されているかどうかを確認した。そして、変異型T7 RNAポリメラーゼF644Yを生産するための発現プラスミドpT7RF644Yを得た。このプラスミドからの変異型T7 RNAポリメラーゼF644Yの生産は、野生型T7 RNAポリメラーゼの生産と同様、本プラスミドを含む大腸菌を培養し、IPTGを添加することにより、発現誘導可能であった。

【0048】

(2)変異型T7 RNAポリメラーゼL665P/F677Yを生産するための発現プラスミドの構築 (図11及び12参照)

変異型T7 RNAポリメラーゼL665P/F667Yの構築は、先のF644Yの構築同様、PCR

法をベースにして以下のように行った。

まず、野生型T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を持つ発現ベクターpT7R中のT7 RNAポリメラーゼ遺伝子領域内に、変異導入操作を容易にするため制限酵素XhoI (CTCG AG)を導入した。更に具体的に述べるとプライマーApaF1 (5'-CAT CTG GTC GCA T TG GGT CAC-3')とプライマーXho-R (5'-CCA AGT GTT CTC GAG TGG AGA-3')の組み合わせで、また、Xho-F (5'-CTA AGT CTC CAC TCG AGA ACA CTT GG-3')とプライマーAfIII-R (5'-CAG CCA GCA GCT TAG CAG CAG-3')の組み合わせで、各々鑄型として発現ベクターpT7Rを用いて、PCRを行った。増幅した前者のDNAフラグメントは制限酵素ApaIとXhoIで、後者の増幅したDNAフラグメントは制限酵素AfIIIとXhoIでそれぞれ反応し、さらに発現ベクターpT7Rを予めApaIとAfIIIで処理して、全てをT4 DNAライゲースを用いて結合させた。この反応物を大腸菌DH5αに形質転換し、抗生物質アンピシリンを含んだ寒天平板上で生育するコロニーを複数得た。このコロニーをいくつか選択し、培養、プラスミドDNAの抽出を行い、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子領域内に制限酵素XhoI部位が生まれたプラスミドpT7R-Xhoを得た(図10参照)。このXhoI部位は、制限酵素XhoIで処理することによって、切断されること及びDNAの塩基配列決定を行い、その存在を確認可能である。このプラスミドpT7R-Xhoを鑄型として、プライマーXho-Rとプライマー667R (5'-GCT GAG TGT ACA TCG GAC CCT-3')の組み合わせとプライマー667F (5'-GCT GAG TGT ACA TCG GAC CCT-3')とプライマーAfIIIRの組み合わせで各々PCRを行った。このPCR産物を直接鑄型として、DNAの塩基配列を決定し、プライマー667Rおよび667Fの配列を確認した後、それぞれを2%アガロース電気泳動(アガロースはニッポンジーン製のアガロースXを使用)を行い、目的の大きさのDNAフラグメントを切り出し、Gene Pure Kitを用いて、このDNAフラグメントを精製した。この精製した2つのDNAを混合し、鑄型としてプライマーXhoF及びAfIIIRを用いてPCRを行い、増幅したDNAフラグメントを制限酵素マッピング、DNA塩基配列の解析により目的のフラグメントであることを確認後、制限酵素XhoIとAfIIIを用いて酵素反応を行い、これを予め制限酵素XhoIおよびAfIIIで処理したプラスミドpT7R-XhoにT4 DNAライゲースを用いて結合させた。この反応物を大腸菌DH5αに形質転換し、抗生物質アンピシリンを含んだ寒天平板上で生育するコロニーを複数得

た。このコロニーをいくつか選択し、培養、プラスミドDNAの抽出を行い、目的の変異が導入されているかをDNA塩基配列の決定を行い、確認し、最終的に目的の変異型T7 RNAポリメラーゼL665P/F644Yを生産するための発現プラスミドpT7RL665P/F667Yを構築した(図12参照)。このプラスミドからの変異型T7 RNAポリメラーゼL665P/F667Yの生産は、野生型T7 RNAポリメラーゼの生産と同様、本プラスミドを含む大腸菌を培養し、IPTGを添加することにより、発現誘導可能であった。

【0049】

実施例3

変異型T7 RNAポリメラーゼの精製

大腸菌に導入した変異型T7 RNAポリメラーゼ蛋白質を精製した。

尚、本蛋白質の野生型については既にChamberlin, M et al. Nature, 228:227-231(1970), Davanloo et al., Proc.Natl. Acad. Sci.USA., 81:2035-2039(1984)に記載されている。さらに大量生産に関しては、Zawadzki, V et al., Nucl. Acids Res., 19:1948(1991)に報告されている。

変異型T7 RNAポリメラーゼは基本的に全て同じ方法で精製できる。変異部位の違いにより、その発現量、カラムクロマトグラフィの挙動が若干異なることもある。以下、変異型T7 RNAポリメラーゼF644Yの精製法を例示する。F644Yの発現ベクターpT7RF644Yを大腸菌DH5 α に導入、抗生物質アンピシリンを含んだLB培地にて、先ず、試験管培養にてOD(600nm) = 0.4~0.6になったとき、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG)を終濃度0.4mMになるように加え、更に8時間培養する。このとき遠心分離により、大腸菌菌体を集め、典型的には2リッターの培養液より10gの湿重量の大腸菌が得られる。この大腸菌菌体を直ぐに使用しない時は、-20℃以下の冷凍庫で保存が可能である。この段階以降の酵素の精製の全ての行程は、特記しない限り、室温以下の温度、好ましくは0~5℃にて実施する。この大腸菌は、このとき菌体重量の10倍の洗浄緩衝液(20mM Tris-HCl, pH 8.1, 130 mM NaCl, 2mM EDTANa₂ at 25℃)で洗い、再び遠心分離(5,000xg、4℃にて10分間)し、10倍量のソニケーション緩衝液[50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTANa₂, 5 mMジチオスレイトール(DTT)、0.1 mMベン

ザミジン, 30 $\mu\text{g/ml}$ フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、10 $\mu\text{g/ml}$ 、バシトラシン] に懸濁し、ソニファイヤー450 (ブランソン社) を用い、80W、15分間超音波処理を行い菌体を破碎、粘度を低下させる。続いて、12,000 $\times g$ 、4℃にて10分間遠心分離し、細胞残渣を除いた。得られた上清を攪拌しながら、10%硫酸ストレプトマイシンをゆっくりと滴下し、終濃度2.0%とした後、更に30分間攪拌を続けた。12,000 $\times g$ 、4℃にて10分間遠心分離し、沈殿を除去し、粉末硫酸をゆっくり添加しながら攪拌し、沈殿を形成させる。この場合、最初に30%飽和硫酸で沈殿を集め(30%硫酸沈殿)、上清は更に60%飽和硫酸になるように硫酸を攪拌しながら添加し、再び沈殿を形成させ(30-60%硫酸沈殿)、更に上清を90%飽和硫酸になるように粉末硫酸を加え、4℃にて1時間攪拌し、遠心し回収した。この3つの硫酸画分の一部をSDS-アクリルアミドゲル電気泳動を行い、蛋白質を分析したところ、目的の変異型T7 RNAポリメラーゼのほとんどは、30-60%硫酸画分に存在し、以後この画分を用いて精製を進めた。30-60%硫酸画分は少量のカラム緩衝液(20 mM KPO_4 , pH7.7, 100 mM NaCl, 1mM DTT, 30 $\mu\text{g/ml}$ PMSF)に懸濁し、同じ緩衝液500mlにて、16時間透析し、脱塩した。この透析液を、カラム体積5mlのヘパリン-セファロース(ファルマシア・バイオテック)に付加する。次いで、このカラムを同緩衝液で、280nmの紫外線吸収物質が検出されなくなるまで洗浄し、カラム体積の約40倍の体積の同一緩衝液中の0.1M~0.64M NaClの直線濃度勾配で溶出する。溶出液は、適当量を試験管に分画して集め、直ぐにSDS-アクリルアミドゲル電気泳動を行い、蛋白質を分析し、目的の変異型T7 RNAポリメラーゼと思われる分子量付近に蛋白質が存在する分画を検査する。典型的な例では0.4MのNaCl付近に見いだされるはずである。この蛋白質を含む分画を集め、約1リッターのカラム緩衝液(20 mM KPO_4 , pH7.7, 100 mM NaCl, 1mM DTT, 30 $\mu\text{g/ml}$ PMSF)に対して16時間透析し、脱塩操作を行った。この透析脱塩した分画を、同緩衝液で予め平衡化した5mlのカラム体積のQ-セファロース(Q-sepharose, ファルマシア・バイオテック)に付加し、同緩衝液で、280nmの紫外線吸収物質が検出されなくなるまで洗浄し、カラム体積の約40倍の体積の同一緩衝液中の0.1M~0.64M NaClの直線濃度勾配で溶出する。溶出液は、適当量を試験管に分画して集め、直ぐにSDS-アクリルアミドゲル電気泳動を行い、蛋白質を分析し、目

的の変異型T7 RNAポリメラーゼと思われる分子量付近に蛋白質が存在する分画を検査する。典型的な例では0.24MのNaCl付近に見いだされるはずである。この蛋白質を含む分画を集め、500mlの保存用緩衝液 (50% glycerol, 20 mM KPO_4 , pH7.7, 100 mM NaCl, 1mM DTT, 30 $\mu\text{g/ml}$ PMSF) に対して16時間透析し、使用まで-20℃にて保存する。この状態で、イン・ビトロのRNA合成活性、或いは混入しているリボヌクレアーゼ活性について試験する。ここでこの方法を例示すると、イン・ビトロRNA合成活性については、T7プロモーターを含むプラスミドを鋳型として用い、野生型T7 RNAポリメラーゼの市販品 (BRL・ギブコ社) を標準品として酵素希釈法を用いて、RNA合成反応を行い、合成したRNAをアガロース電気泳動する事により、おおよその力価を推定した。このとき、合成されたRNAの分解の程度も観察されるため、同時に混入リボヌクレアーゼに関しての、簡単な検定も可能である。典型的な例として、以上のような工程を踏まえた精製法で、1リッターの培養液から2,500,000単位の変異型T7 RNAポリメラーゼF644Y蛋白質が精製され、この標品にはほとんどRNaseの混入は認められない。

【0050】

実施例4

3' dNTP誘導体の取り込み率の改善

精製された変異型T7 RNAポリメラーゼF644Y及びL665P/F667Yを用いて3' dNTPの取り込み効率を野生型T7 RNAポリメラーゼと以下のように比較した。

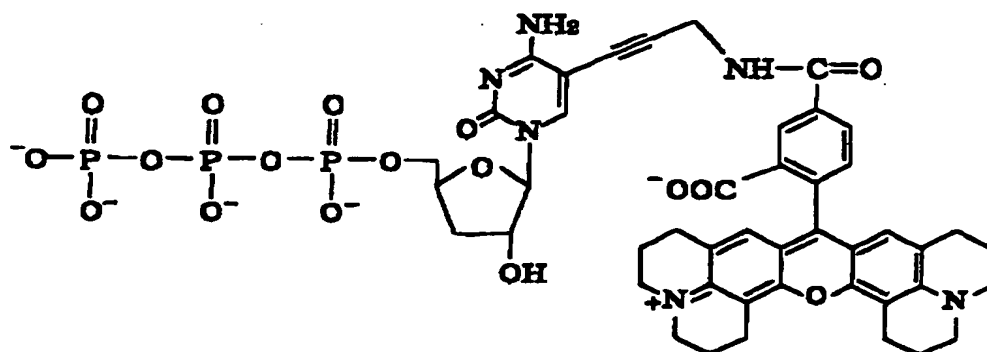
イン・ビトロでの転写反応は、例えば、Melton, D.A, [Nucleic Acids Res., 12: 7035-7056(1984)] によって示された方法を一部改良して行った。さらに具体的に述べると、T7プロモーターを有するプラスミドベクターpBluescriptKS(+) (ストラタジーン社) を、制限酵素PvuIIあるいはScaIで反応し、線状にしたものを鋳型として用い、3' dNTPの誘導体として、W096/14434に記載された方法を参照して合成したダイ・ターミネーターである5-カルボキシ-X-ローダミン標識 3'-デオキシシチジン-5-トリフォスフェートを150 μM , さらに500 μM GTP, UTP及び250 μM ATP, CTP, 8mM MgCl_2 , 2mM spermidine-(HCl)₃, 5mM DTT, 40mM Tris/HCl pH 8.0 (BRL,ギブコ社) の条件下に、野生型T7 RNAポリメラーゼ(BRL, ギブコ社あるいはニッポンジーン製)、変異型T7 RNAポリメラーゼF644YあるいはL665P/F

667Y 25単位を加えて、合計反応体積 $10\mu\text{l}$ として、 37°C で1時間反応を行った。次に反応産物中に残存している未反応のダイ・ターミネーターを除去するため、セファデックスG-50カラム（ファルマシア・バイオテク）を用いたゲル濾過法により転写産物を精製し、精製産物は遠心式エバポレーターを用いて蒸発乾固した。

上記5-カルボキシ-X-ローダミン標識 3'-デオキシシチジン-5-トリフォスフェートは、以下の化学式で示される化合物である。

【0051】

【化1】



【0052】

乾燥させた反応物を株式会社パーキンエルマージャパンのABI PRISM 377 DNA Sequencing System取り扱い説明書Ver.1.0に従い、ホルムアミド/EDTA/Blue dextrans loading buffer $6\mu\text{l}$ に溶解し、そのうち $2\mu\text{l}$ を、6M尿素/4%ロングレンジャーTMアクリルアミド溶液（FMC）を含むシーケンス解析用変性ゲルを用い、ABI 377 DNA Sequencer及び解析プログラムにより解析した。その結果を図13にゲル・イメージとして示す。変異型T7 RNAポリメラーゼF644Yは野生型T7 RNAポリメラーゼに較べて、約3倍のシーケンスラダーが得られることが判明し、約700塩基の転写産物も確認された。

【0053】

更に図14及び図15に、それぞれF664Y及びL665P/F667Yを用いて得られたシーケンスラダーのピーク強度を野生型T7 RNAポリメラーゼを用いて得られたピ

ーク強度と対比して示す。この対比から、変異型酵素のピークの高さは、野生型と較べてバラツキが少なく、さらに強いシグナルをもつピークが得られた。これは、F664YあるいはL665P/F667Yの変異によって、この場合、3' dCTP誘導体の取り込み率が改善されたことを示し、さらに、この変異型T7 RNAポリメラーゼによる転写反応が、既に存在するDNAポリメラーゼによる塩基配列決定法のデータ生産力に匹敵するラダー伸長反応特性を持っていることを示している。

【0054】

実施例 5

変異型T7 RNAポリメラーゼを用いたダイ・ターミネーター法によるシーケンス反応例

ダイ・ターミネーター法によるシーケンス反応を、精製された変異型T7 RNAポリメラーゼF644Y及びL665P/F667Yと野生型T7 RNAポリメラーゼについて以下のように比較した。

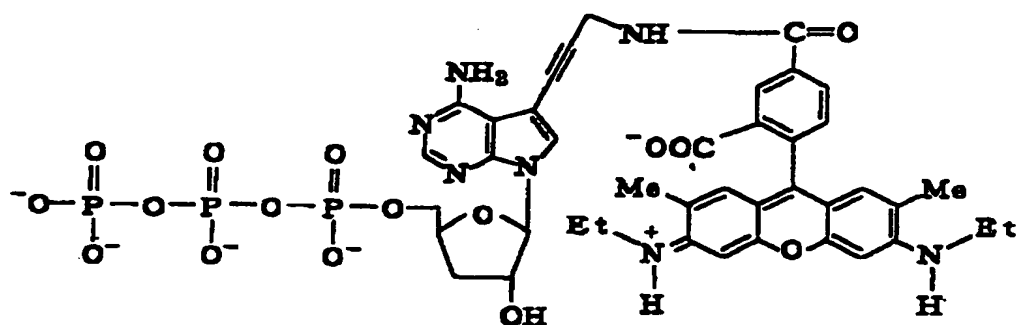
イン・ビトロでの転写反応は、実施例4で例示した、Melton, D.A. (1984, *Nucleic Acids Res.*, 12: 7035-7056)によって示された方法を用いた。さらに具体的に述べると、T7プロモーターを有するプラスミドベクターpBluescriptKS(+)を、制限酵素PvuIIあるいはScaIで反応し、線状にしたものを鋳型として用い、3' dNTPの誘導体として、W096/14434に記載された方法を参照して合成したダイ・ターミネーター、5-カルボキシローダミン6G標識 3'-デオキシアデノン-5-トリフォスフェート、5-カルボキシローダミン110標識 3'-デオキシグアノシン-5-トリフォスフェート、5-カルボキシ-X-ローダミン標識 3'-デオキシシチジン-5-トリフォスフェート、5-カルボキシテトラメチルローダミン標識 3'-デオキシウリジン-5-トリフォスフェート、さらに500 μ M GTP, UTP及び250 μ M ATP, CTP、8mM $MgCl_2$ 、2mM spermidine-(HCl)₃、5mM DTT、40mM Tris/HCl pH 8.0 (BRL, ギブコ社)の条件下に、野生型T7 RNAポリメラーゼ(BRL, ギブコ社あるいはニッポンジーン製)あるいは変異型T7 RNAポリメラーゼF644Y 25単位を加えて、合計反応体積10 μ lとして、37℃で1時間反応を行った。次に反応産物中に残存している未反応のダイ・ターミネーターを除去するため、セファデックスG-50カラム (ファルマシア・バイオテック製)を用いたゲル濾過法により転写産物を精製し、精製産物

は遠心式エバポレーターを用いて蒸発乾固した。

上記5-カルボキシ-X-ローダミン標識 3'-デオキシシチジン-5-トリフォスフェートは、実施例4で使用したものと同一の化合物である。また、5-カルボキシローダミン6G標識 3'-デオキシアデノン-5-トリフォスフェート、5-カルボキシローダミン110標識 3'-デオキシグアノシン-5-トリフォスフェート、及び5-カルボキシテトラメチルローダミン標識 3'-デオキシウリジン-5-トリフォスフェートは以下の化学式で示される化合物である。

【0055】

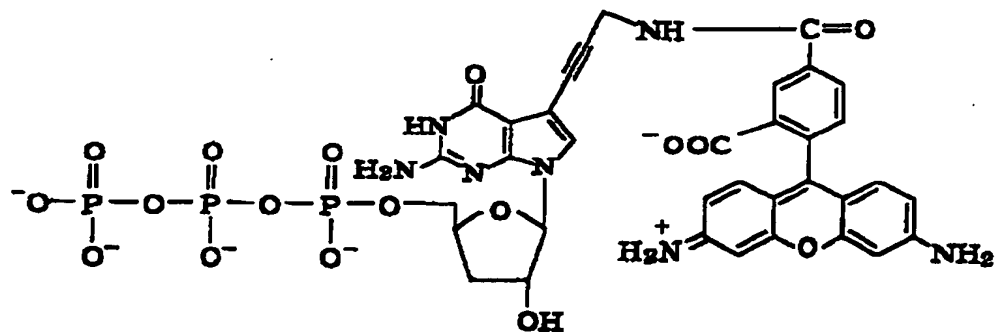
【化2】



5-カルボキシローダミン6G標識 3'-デオキシアデノン-5-トリフォスフェート

【0056】

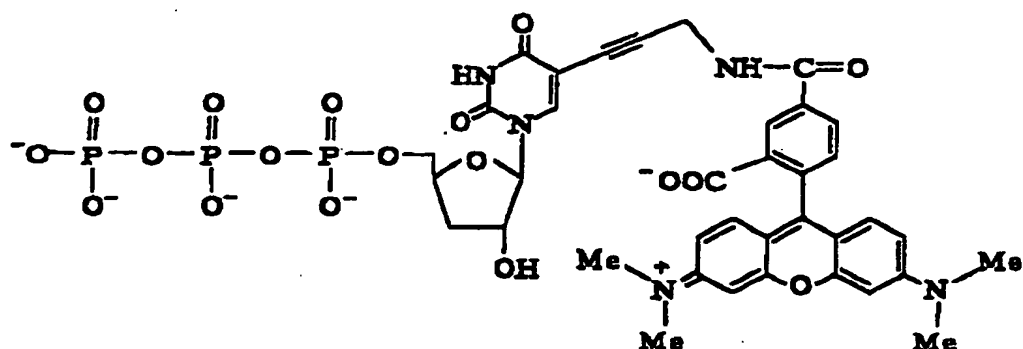
【化3】



5-カルボキシローダミン110標識 3'-デオキシグアノシン-5-トリフォスフェート

【0057】

【化4】



5-カルボキシテトラメチルローダミン標識 3'-デオキシウリジン-5-トリフォスフェート

【0058】

乾燥させた反応物を株式会社パーキンエルマージャパンのABI PRISM 377 DNA Sequencing System取り扱い説明書Ver.1.0に従い、ホルムアミド/EDTA/Blue dextrane loading buffer 6 μ lに溶解し、そのうち2 μ lを、6M尿素/4%ロングレンジャーTMアクリルアミド溶液（FMC）を含むシーケンス解析用変性ゲルを用い、ABI 377 DNA Sequencer及び解析プログラムにより解析した。その結果、図16に提示したが、変異型T7 RNAポリメラーゼF644YあるいはL665P/F667Yは野生型T7 RNAポリメラーゼに比べて、ピーク強度が高く、更にバラツキが少なく、シーケンス読みとりが可能であることが判明した。ここで野生型T7 RNAポリメラーゼを用いた場合、ほとんどシーケンスは不可能であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 T7 ファージゲノム上のT7 RNAポリメラーゼ遺伝子とコードされているT7 RNAポリメラーゼのアミノ酸配列（前半）。上段は、塩基配列、下段はその配列に対応するアミノ酸配列を示した。右端の数字は、塩基配列の場合、DNA配列データベースGeneBankに登録されているT7ファージゲノム(Locus T7CG, 39,937塩基対)の番号を示し、アミノ酸の番号は、T7 RNAポリメラーゼき最初のM(メチオニン)を1として、全長883アミノ酸残基からなっていることを示す。

【図2】 T7 ファージゲノム上のT7 RNAポリメラーゼ遺伝子とコードされているT7 RNAポリメラーゼのアミノ酸配列（後半）。上段は、塩基配列、下段はその配列に対応するアミノ酸配列を示した。右端の数字は、塩基配列の場合、DNA配列データベースGeneBankに登録されているT7ファージゲノム(Locus T7CG, 39,937塩基対)の番号を示し、アミノ酸の番号は、T7 RNAポリメラーゼき最初のM(メチオニン)を1として、全長883アミノ酸残基からなっていることを示す。

【図3】 現在報告されているファージ由来RNAポリメラーゼのアミノ酸配列の比較（前半）。最上段のT7 RNAポリメラーゼを基準として、.はT7 RNAポリメラーゼと同一のアミノ酸、-は欠損、最下段の*はすべてのポリメラーゼに共通しているアミノ酸であることを示す。

【図4】 現在報告されているファージ由来RNAポリメラーゼのアミノ酸配列の比較（後半）。最上段のT7 RNAポリメラーゼを基準として、.はT7 RNAポリメラーゼと同一のアミノ酸、-は欠損、最下段の*はすべてのポリメラーゼに共通しているアミノ酸であることを示す。

【図5】 T7 RNAポリメラーゼの変異部位導入部位の詳細図。白ぬき文字は、変異導入されたアミノ酸であることを示している。

【図6】 T7 RNA ポリメラーゼとT3 RNAポリメラーゼのアミノ酸配列の比較（前半）。最上段のT7 RNAポリメラーゼを基準として、.は同一のアミノ酸、-は欠損、最下段の*は2つのポリメラーゼに共通しているアミノ酸であることを示す。

【図7】 T7 RNA ポリメラーゼとT3 RNAポリメラーゼのアミノ酸配列の比較（後半）。最上段のT7 RNAポリメラーゼを基準として、.は同一のアミノ酸、-は欠損、最下段の*は2つのポリメラーゼに共通しているアミノ酸であることを示す。

【図8】 T7 RNAポリメラーゼの残基641-667の前後の配列と、それに対応する領域のT3 RNA ポリメラーゼ、K11 RNA ポリメラーゼ、及びSP6 RNA ポリメラーゼアミノ酸配列を示す。T7RNAポリメラーゼについては、残基を全て示したが、対応するT3, K11, SP6についてはT7と同じ残基については・(ドット)で示した。

【図9】 野生型T7 RNAポリメラーゼを発現するプラスミド、pT7Rの構築図。

【図10】 変異型T7RNA ポリメラーゼF644Yを発現するプラスミド、pT7RF644Y

の構築図。

【図11】 T7 RNAポリメラーゼ遺伝子中に制限酵素XhoI部位を持つ、pT7Rの改良型プラスミド、pT7R-Xhoの構築図。

【図12】 変異型T7RNA ポリメラーゼL665P/F667Yを発現するプラスミド、pT7RL665P/F667Yの構築図。

【図13】 変異型T7 RNAポリメラーゼによるダイ・ターミネーターの取り込み率の改善。野生型T7 RNAポリメラーゼ(WT)、変異型T7 RNAポリメラーゼF644Y(F644Y)、変異型T7 RNAポリメラーゼL665P/F667Y(F667Y)。

【図14】 変異型T7 RNAポリメラーゼF644Yによるダイ・ターミネーターの取り込み率の改善。エレクトログラムとして表示した。野生型T7 RNAポリメラーゼ(WT)、変異型T7 RNAポリメラーゼF644Y(F644Y)。

【図15】 変異型T7 RNAポリメラーゼL665P/F667Yによるダイ・ターミネーターの取り込み率の改善。エレクトログラムとして表示した。野生型T7 RNAポリメラーゼ(WT)、変異型T7 RNAポリメラーゼL665P/F667Y(F667Y)。

【図16】 シークエンス反応例 野生型T7 RNAポリメラーゼ(WT)、変異型T7 RNAポリメラーゼF644Y(F644Y)、変異型T7 RNAポリメラーゼL665P/F667Y(F667Y)を用いて反応した。何れも同じ領域のシークエンスパターンを示した。

【書類名】

図面

【図 1】

AGGCACTAAATGAACACGATTAACATCGCTAAGAACGACTTCTCTGACATCGAACTGGCTGCTATCCCGTTCAACACT:3239
M N T I N I A K N D F S D I E L A A I P F N T :23
CTGGCTGACCATTAAGCTGAGCGTTAGCTCGGAACAGTTGGCCCTTGAGCATGAGTCTTACGAGATGGGTGAAGCA:3317
L A D H Y G E R L A R E Q L A L E H E S Y E M G E A :49
CGCTTCCGCAAGATGTTGAGCGTCAACTTAAAGCTGTGAGGTGCGGATAACGCTGCCCAAGCCTCTCATCACT:3395
R F R K M F E R Q L K A G E V A D N A A A K P L I T :75
ACCTTACTCCCTAAGATGATTCACGCTCAACGACTGTTGAGGAAGTGAAGCTAAGCGCGGAAGCGCCCGACA:3473
T L L P K M I A R I N D W F E E V K A K R G K R P T :101
GCCCTCCAGTTCCTGCAAGAAATCAAGCCGGAAGCGTAGCTACATCACCATTAAGACCACCTCTGGCTTGCCCTAACCC:3551
A F Q F L Q E I K P E A V A Y I T I K T T L A C L T :127
AGTCTGACAATACAAACCGTTGAGGTGAGCAAGCGCAATCGTGGGCCATTGAGGACGAGGCTCGCTTCGGTGGT:3629
S A D N T T V Q A V A S A I G R A I E D E A R F G R :153
ATCCGTGACCTTGAAGCTAAGCACTTCAAGAAAACGTTGAGGAACAACCTCAACAAGCGGTAGGGCACGCTTACAAG:3707
I R D L E A K H F K K N V E E Q L N K R V G H V Y K :179
AAAGCATTTATGCAAGTTGTCGAGGCTGACATGCTCTCTAAGGGTCTACTCGGTGGCGAGCGGTGCTCTCGTGGCAT:3785
K A F M Q V V E A D M L S K G L L G G E A W S S W H :205
AAGGAAGACTCTATTTCATGAGGATCGCTGTCATCGAGATGCTCATTTGAGTCAACCGGAATGGTTAGCTTACACCGC:3863
K E D S I H V G V R C I E M L I E S T G M V S L H R :231
CAAAATCTGGCTAGTGAAGTCAAGACTCTGAGACTATCGAACTCGCACCTGAATACGCTGAGGCTATCGCAACCCGT:3941
Q N A G V V G Q D S E T I E L A P E Y A E A I A T R :257
GCAGGTGGCTGGCTGCTCTCCGATGTTCCAACTTGGCTAGTTCCTCTAAGCCGTGGACTGGCATTACTGGT:4019
A G A L A G I S P M F Q P C V V P P K P W T G I T G :283
GGTGGCTATTGGCTAACGGTCTGCTCTTGGCGCTGCTGCTACTCACAGTAAGAAAGCACTGATGCGCTACGAA:4097
G G Y W A N G R R P L A L V R T H S K K A L M R Y E :309
GACGTTTACATGCCCTGAGGTGTACAAAGCGATTAACATTCGCAAAACACCGCATGGAAATCAACAAGAAAGTCTTA:4175
D V Y M P E V Y K A I N I A Q N T A W K I N K K V L :335
GCGGTGCCCAACGTAATCACCAAGTGAAGCATTCGCTCGGTGAGGACATCCCTCGGATGAGCGTGAAGAACTCCCG:4253
A V A N V I T K W K H C P V E D I P A I E R E E L P :361
ATGAACCGGAAGACATCGACATGAATCCTGAGGCTCTCACCGCTGGAACGCTGCTGCCGTGCTGTACCGCAAG:4331
M K P E D I D M N P E A L T A W K R A A A A V Y R K :387
GACAAGGCTCGCAAGTCTCGCGTATCAGCCTTGAGTTCATGCTGAGCAAGCCAATAAGTTTGTAACTAAGGCC:4409
D K A R K S R I S L E F M L E Q A N K F A N H K A :413
ATCTGGTTCCTTACACATGGAATGGCGGCTGCTGTGTCATGTTCAACCCGCAAGCAACGATATG:4487
I W F P Y N M D W R V V Y A V S M F N P Q G N D M :439
ACCAAGGACTGCTTACGCTGGCGAAAGGTAAACCAATCGGTAAGGAAGTACTACTGGCTGAAATCCACGGTGCA:4565
T K G L L T L A K G K P I G K E G Y Y W L K I H G A :465

【図2】

AACTGTGCGGGTGTGCGATAAGGTTCCGTTCCCTGAGCGCATCAAGTTTCATTTGAGGAAACCACGAGAACATCATGGCT:4643
 N C A G V D K V P P F P E R I K F I E E N H E N I M A :491
 TGGCTAAGTCTCCACTGGAGAACACTTGGTGGCTGAGCAAGATTCTCCGTTCTGCTTCTCCTTGGCTTCTGCTTTGAG:4721
 C A K S P L E N T W W A E Q D S P F C F L A F C F E :517
 TAGCTGGGGTACAGCACCGCCCTGAGCTATAACTGCTCCCTCCGCTGGCGTTTGACGGGTCTTGTCTCTGGCATC:4799
 Y A G V Q H H G L S Y N C S L P L A F D G S C S G I :543
 CAGCACTTCTCCGCGATGCTCCGAGATGAGGTAGGTGCTGCGCGGTAACTTGTCTTCTAGTGAACCCGTTTCAGGAC:4877
 Q H F S A M L R D E V G G R A V N L L P S E T V Q D :569
 ATCTACGGGATTGTGCTAAGAAAGTCAACGAGATTCTACAAGCAGCAATCAATGGGACCGATACGAAGTAGTT:4955
 I Y G I V A K K V N E I L Q A D A I N G T D N E V :595
 ACCGTGACCGATGAGAACACTGGTGAATCTCTGAGAAAGTCAAGCTGGGCACATAAGGCACCTGGCTGGTCAATGGCTG:5033
 T V T D E N T G E I S E K V K L G T K A L A G Q W L :621
 GCTTACGGTGTACTCGCAGTGTGACTAAGCGTTCACTGACGCTGGCTTACGGTCCAAAGAGTTCCGGCTTCCGT:5111
 A Y G V T R S V T K R S V M T L A Y G S K E F G F R :647
 CAACAAGTGTGGAAGATACCATTACGCCAGCTATTGATTCGGCAAGGCTCTGATGTTCACTCAGCCGAATCAGGCT:5189
 Q Q V L E D T I Q P A I D S G K G L M F T Q P N Q A :673
 GCTGGATACATGGCTAAGCTGATTGGGAATCTGTGAGCGTGACGGTGGTAGCTGCGGTTGAAGCAATGAATGCTT:5267
 A G Y M A K L I W E S V S V T V V A A V E A M N W L :699
 AAGTCTGCTGTAAGCTGCTGGCTGCTGAGGTCAAGATAAGAAGACTGGAGAGATTCTTCGAAGCGTTGCGCTGTG:5345
 K S A A K L L A A E V K D K K T G E I L R K R C A V :725
 CATTGGTAACTCCTGATGGTTTCCCTGTGTGGCAGGAATACAGAAGCCTATTTCAGACGCGCTTGAACCTGATGTT:5423
 H W V T P D G F P V W Q E Y K K P I Q T R L N L M F :751
 CTCGGTCAGTTCCGCTTACAGCCCTACCATTAAACACCAACAAAGATAGCGAGATTGATGCACACAAACAGGAGTCTGGT:5501
 L G Q F R L Q P T I N T N K D S E I D A H K Q E S G :777
 ATCGCTCCTAACTTTGTACACAGCCAGCGGTAGCCACCTTCGTAAGACTGTAGTGTGGGCACACGAGAGTACGGA:5579
 I A P N F V H S Q D G S H L R K T V V W A H E K Y G :803
 ATCGAATCTTTTGCACGTGATTCAGGACTCCCTTCGGTACCATTCCGGCTGACGCTGGCAACCTGTTCAAGCAGTCCGC:5657
 I E S F A L I H D S F G T I P A D A A N L F K A V R :829
 GAAACTATGGTTGACACATATGAGTCTTGTGATGTACTGGCTGATTCTACGACCACTGCTGACCACTGTCACGAG:5735
 E T M V D T Y E S C D V L A D F Y D Q F A D Q L H E :855
 TCTCAATTGGACAAATGCCAGCACCTTCCGGCTAAAGGTAACTTGAACCTCCGCTGACATCTTAGAGTCGGACTTCCGG:5813
 S Q L D K M P A L P A K G N L N L R D I L E S D F A :881
 TTCGCGT:5820
 F A :883

【図 3】

```

T7 1:MNTI-NIAKNDFSDIELAAPFNTLADHYGERLARLEQALAEHESYEMGEARFKMFERQLKAGEVADNAAKPLITT
T3 1:..I.E..E.....E.....SA.K.....L.R.L..L..A....I.....LA.
K11 1:..AL-..GR....E.....Y.I.SE..DOA.....A..L.RQ..L..L..V....F.....VL.
SP6 1:-----MQLH I-.Q..E.MFNG.IR..EADQQ..IA..SES.T.WNRR.LSE
      * ** * * * *
T7 80:KMIARINDWFEEVIAKRGKRPTAFQFL-QEIKPE-A---VAYI-TIK-----TTLA---CLTSADNT-TVQ--A
T3 81:LTT..VE.L..YAS.K.RK.S.YAP.-.LL...-S.F.-.L..-----VI.....-8...TNM.-.I.-.
K11 80:QLTK..D..K..QANA...K.R.YYPIKHGVAS.L.VBMG.EVLKE.RGVSSHEAL.TIKVV.GN.HRPLKGNP.
SP6 52:P.AEG.OAYK..YEG.K.RA.R.LA..Q-CVEN.--VA--.-YI.M.--V-----M--DM--.-NT.A.L---Q-.
      * ** * * * *
T7 140:AIGRAIENEARFGIRINDLEAKHFKKNVEQLNKRKVGHEVYKKAQMVVEADMLSKGLLG-EAWSSWHKEDSIHVGV
T3 141:ML.K.....H.....H.Q.....IGR.....D..TTM...I.
K11 160:QL.K.L.....EQ..AY.....AD..D.....I...M...-DN.A..KTDEOM...TK
SP6 110:SVAER...QV..SKLEHA..Y.E.-.KKS.KASRTKS.RH.HNVA.V.EKSAEKDADFDR.EA.P..TQLOI.TT
      ** ** * * * *
T7 219:MLIESTGMSLHRQN-A-GVVG-QDSEIIEAPAEBAIATR-AGALAGISPNFQPCVPPKPTGITGGGYN-ANG
T3 220:.....L.E.Q.H.-.-NA.-S.H.ALQ..Q..VDVL.K.-.....VA.....-
K11 239:L...G..L.EMTKNM.D.SDDVTSMQWQ...AFV.LLSK.-.....H.....VETV.....-SV.
SP6 189:I.-.GSVFYNGEPVFMRAMRTYGGKTIYLOTS.SVGQWISAFKEHV.QL..AYA...I..R..RTFFN..PHEKV.
      * * * *
T7 294:LALVRTHSKKALRYEDVYMPYEVYKAINIAONTAKINKKVLAVANVITRWK-ECPVED-IPAIEREELP--MKPED
T3 295:.....G.....V.L.....V.E.VN..-N..A.-.SL..Q.....P..D.
K11 317:.....R.A..H.....V.L...P.V.....V.E.VN..-G..V.....-PR.D.
SP6 268:IR..KGN-REHVRLTQKQ..K.....AL...Q.Q..D....IEEVIRLDLGYG.PSFK.L.DK.NK.ANEV.VE
      ** **** * * * *
T7 367:I---D-MNPEALTAW-----KRAA--AAVYRKDKAKSRBRISLEFMLEQANFANHKAINTFPYNDWGRVY-AVSMF
T3 368:---T.EA..KE.-----K...GI..L...V.....SK.....-P..
K11 390:---T.EV.RK.---RKS...Q.....C.RC...VA.....-
SP6 347:LRGRELKEMLSPEQ.QQFINWKGC.RL.TAETR.G.KSAAVVR.VG..R.YSAFES.Y.V.A..S..S...VQS.TL
      * * * *

```

【図 4】

```
T7 436:GNDMTAGLLTLAKGP1-GKEGYTWLKHGANCAVDKVPFPERI-KFIEENHEINI-MACAKSPLENTWAEQDSPFT
T3 437:.....E.F.....-A...XHVDD.-L....D.IN.....
K11 459:.....S.....LD.F.....EG..-L.S.AD.N....TO.....
SP6 427:S.LG.A..RPTTE.R.VN.V.ALK.FC.N...LM.W.KT.DV.VSNULD.EFQDMCRDI.AD..TF.Q..KA.A.Y
** * * * * * ** * * * * * ** * * * * *
```

```
T7 513:AFCFEYA---GVQHGG-L-SYNCSLPIAFDGSCSGIQHFSAMLRLDEVGGRAVNLPSBETVQDIYGIVAKVNELLQA
T3 514:.....T.....-.....Q.....Q.....KO
K11 536:.....K.....-N.....SI.....D.....K.D..-V.HO
SP6 507:W....QYLVLVE.RADEFRATE.VHQ.....Y.....AK....K.DAP.....A.-Q.---V-I
* **** * ***** ***** * **** **
```

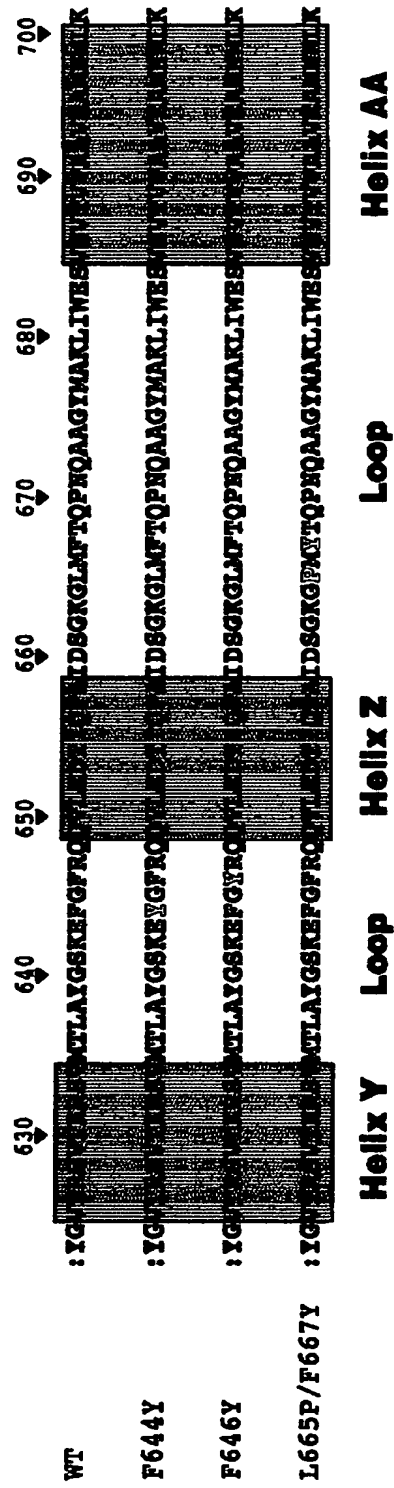
```
T7 588:NGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKGTKALAGOMLAIGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQ-PAIDSGK
T3 589:...P.MI....KD....L...ST..Q.....D.....-.....
K11 611:.SQTV.EQLA.KE...FH...T.ESV.A..Q....K.....SLV.....-.....N.E
SP6 581:.ALYMDADDA.TFTS.SVTLSGT-ELR.M.SA.DSI.I..L.KP...P...TRLTC.BS.IDITYDLSEKKRAQ.
* * * * *
```

```
T7 667:FT-QPNQAAGYNMAKLWESVSVTVAABEAAMNWLASAAKLAAEVOKKTGETLR---KRC-AVHWVTPDGFPPWOCE
T3 668:..-.....DA.....K.....H.....T.....
K11 690:-H.....DA.T.....K.V.....-I.....
SP6 660:EGRTA.XVHPFEDDRQDYLTPGAANYMT.LI.PSISEVVK.PI.AM.MIROLA.FAA..NEGIMTYL.T..ILE.K
* * * * *
```

```
T7 742:PIQTIRINMLFLQGFRLOPTINTNKDSIDAHKQESGIAPNVFHSODGSHLRXTVWAHBKYGIESPALIHDSFGTIP
T3 743:L.K.DWI.....L.G.....M...Y.....
K11 765:ON.A..K.V....ANVM.Y..G.....M...H.N.V..D.....S...
SP6 740:TEM.LVRTCLM.DIKMSLOVE---IV.EAAMMGAA.....GH.A...IL.CELVD-.VT.I.V.....HA
* * * * *
```

```
T7 822:ANLFRAVBRETNVDYTESCDVLADFYOFAQOLHESOLDKPALPAKNLMLRDILESDFAPA
T3 823:GK.....I...NM.....S.....T.....P.K.....Q..K.....
K11 845:G.....K..DN.I.....V.....D.....
SP6 816:LT.RV.LKGQ..AM.IDGNA.OKL-LE-EHEVR-WMV.TGLEV.EQ.EFD.NE.MD.EYW..
* * * * *
```

【图 5】



【図6】

```

T7RNaPol 1:MNTI-NIAKDFSDIELAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQL
T3RNaPol 1:..I.E..E.....E.....SA..K.....L..R..L..L...A
          ** * ** ***** ** ***** ** ** ** **
          ** * ** ***** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** **

T7RNaPol 60:KAGEVADNAAKPLITILLPKMIARINDWFEVAKRGKRPTAFQFLQEIKEPAVAYITI
T3RNaPol 61:....I.....LA.....LTT..VE.L..YAS.K.RK.S.YAP..LL.....S.F..L
          **** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
          **** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

T7RNaPol 120:KTTLACLTSAADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYK
T3RNaPol 121:..VI..S...TNM..I..A.GML.K.....H.....E.Q...
          * ** ** * ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
          * ** ** * ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

T7RNaPol 180:KAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGRCIEMLIESTGMVSLHRQNAVGVGQ
T3RNaPol 181:.....IGR.....D...TM...I.L.....L.E.Q.H...NA.S
          ***** ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
          ***** ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

T7RNaPol 240:DSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVPPKPTGITGGYWGRRPLALVRT
T3RNaPol 241:..H.ALQ..Q..VDVL.K.....VA.....
          * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
          * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

T7RNaPol 300:HSKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKKHCPVEDIPAEREE
T3RNaPol 301:....G.....V.L.....V.E.VN..N...A...SL..Q.
          **** ***** ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *
          **** ***** ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *

T7RNaPol 360:LPMKPEDIDMNPALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYN
T3RNaPol 361:..P..D...T.EA..KE...K...GI..L....V.....SK.....
          ** ** ** * ** * ** * ** * ** ***** ** ***** ** *****
          ** ** ** * ** * ** * ** * ** ***** ** ***** ** *****

```

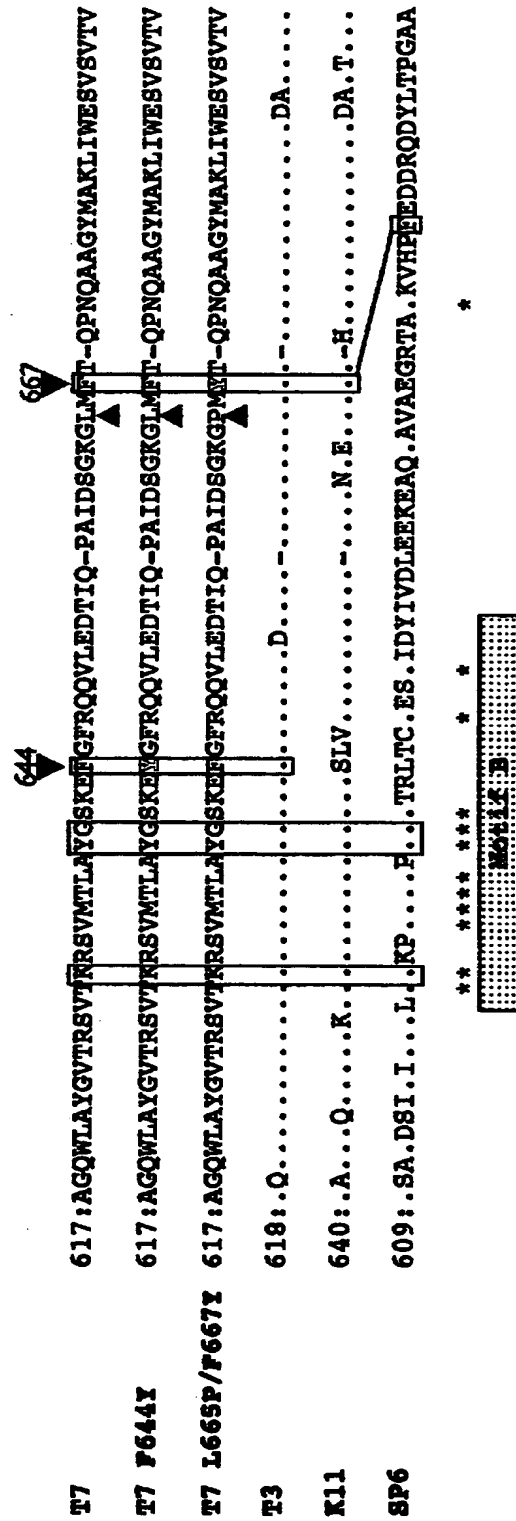
【図 7】

```

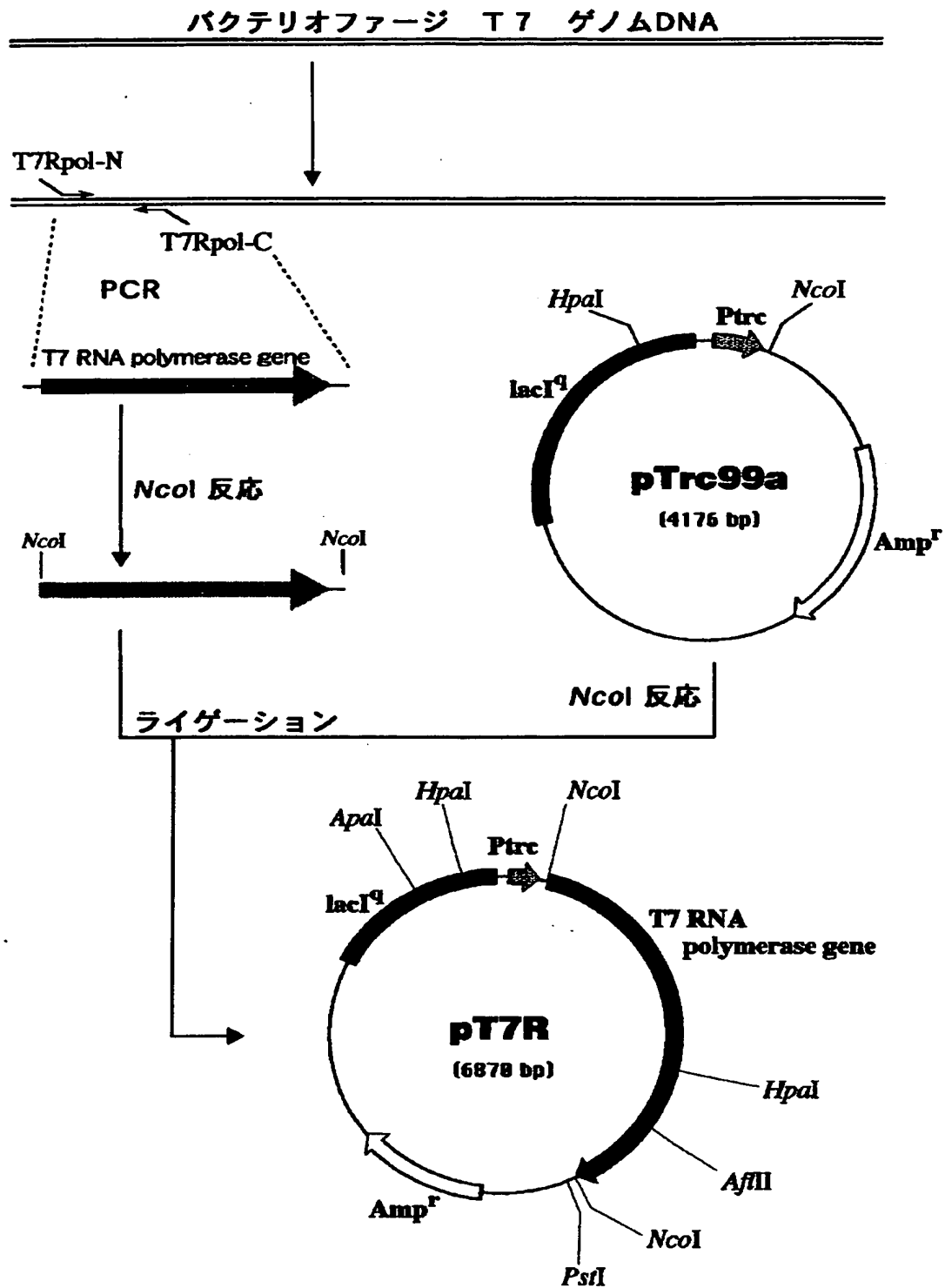
T7RNApol 420:MDWRGRVYAVSMFNPQNDMTKGLLTAKKPIGKEGYTWLKHGANCAGVDKVPFPERI
T3RNApol 421:.....P.....E..F.....
*****
T7RNApol 480:KFIEHHENIMACAKSPLEHTWAQDSPFCFLAFCFYAGVQHGLSYNCSLPLAFTGS
T3RNApol 481:A...KHVDD.L....D.IN.....T.....
*** * **** * *****
T7RNApol 540:CSGIQHFSAMLRDEVGGRVWLLPSETVQDIYGVAKKVNELQADAINGTDNEVTVTTD
T3RNApol 541:.....Q.....KQ.....P..MI.....
*****
T7RNApol 600:ENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAGVTRSVTKRSVMTLAYGSKFGRQQVLEDTIQPAI
T3RNApol 601:KD.....L....ST..Q.....D.....
*****
T7RNApol 660:DSGKGLMFTQPNQAGYNAKLIWESVSVTVVAAVEANWNLKSAKILLAAEVKDKKTCHEIL
T3RNApol 661:.....DA.....K...
*****
T7RNApol 720:RKRCVHWVTPDGFVWQETKPIQTRNLNMLGQFRLQPTINTNKDSHIDAHKQESGIA
T3RNApol 721:H.....T.....R..L.K..DMI.....L..G.....
* **** * *****
T7RNApol 780:PNFVHSQDGSHLKRTVWVWHEKYGIESPALIHDSFGTIPADAANLTKAVRETAVDITYESC
T3RNApol 781:.....M...Y.....GK.....I...NN
*****
T7RNApol 840:DVLAIFYDQFADQLHESQLDKPAPALPAKGNLNLRLIESDFAPA
T3RNApol 841:.....S.....T.....P..K.....Q...K.....
*****

```

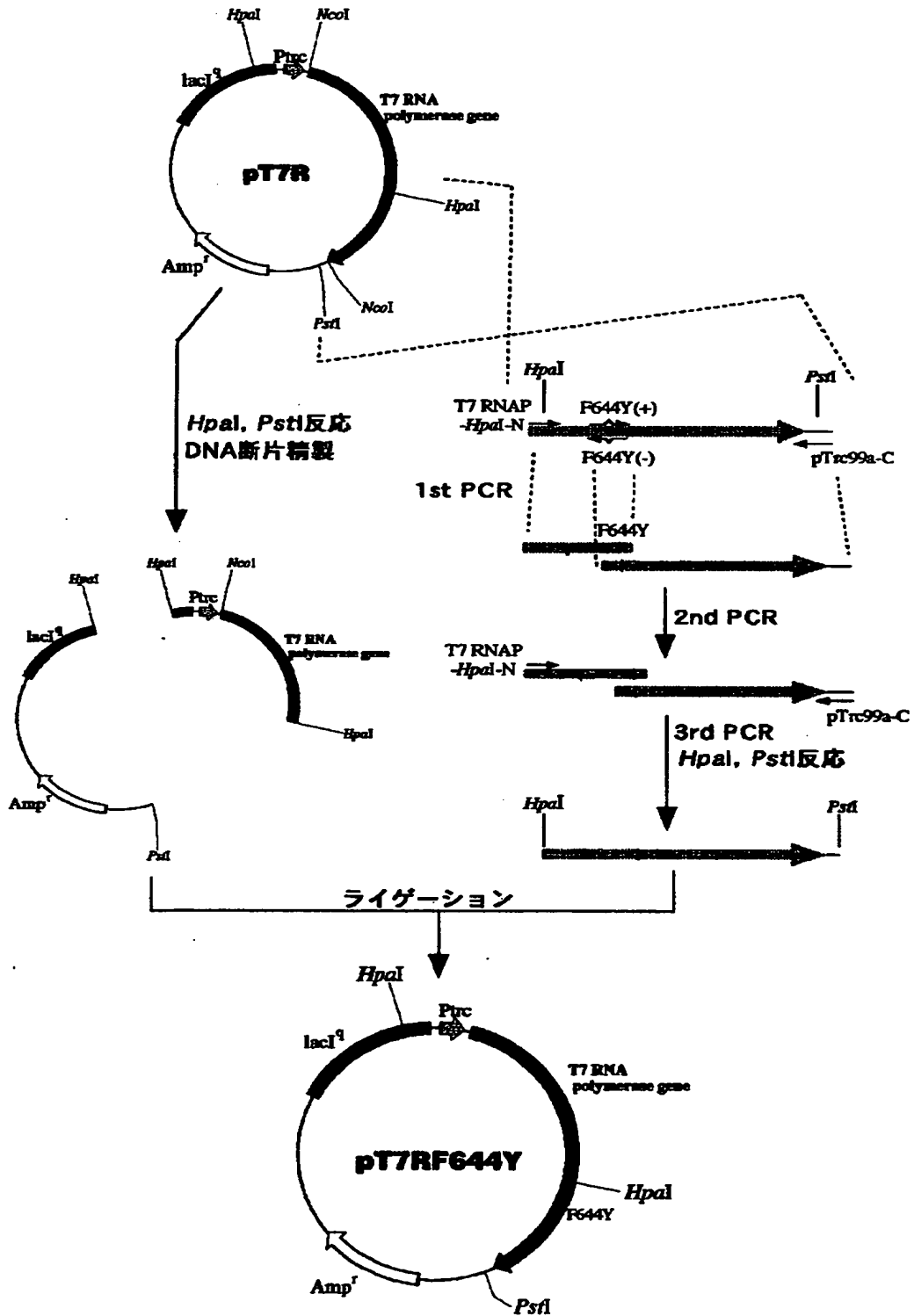
【図 8】



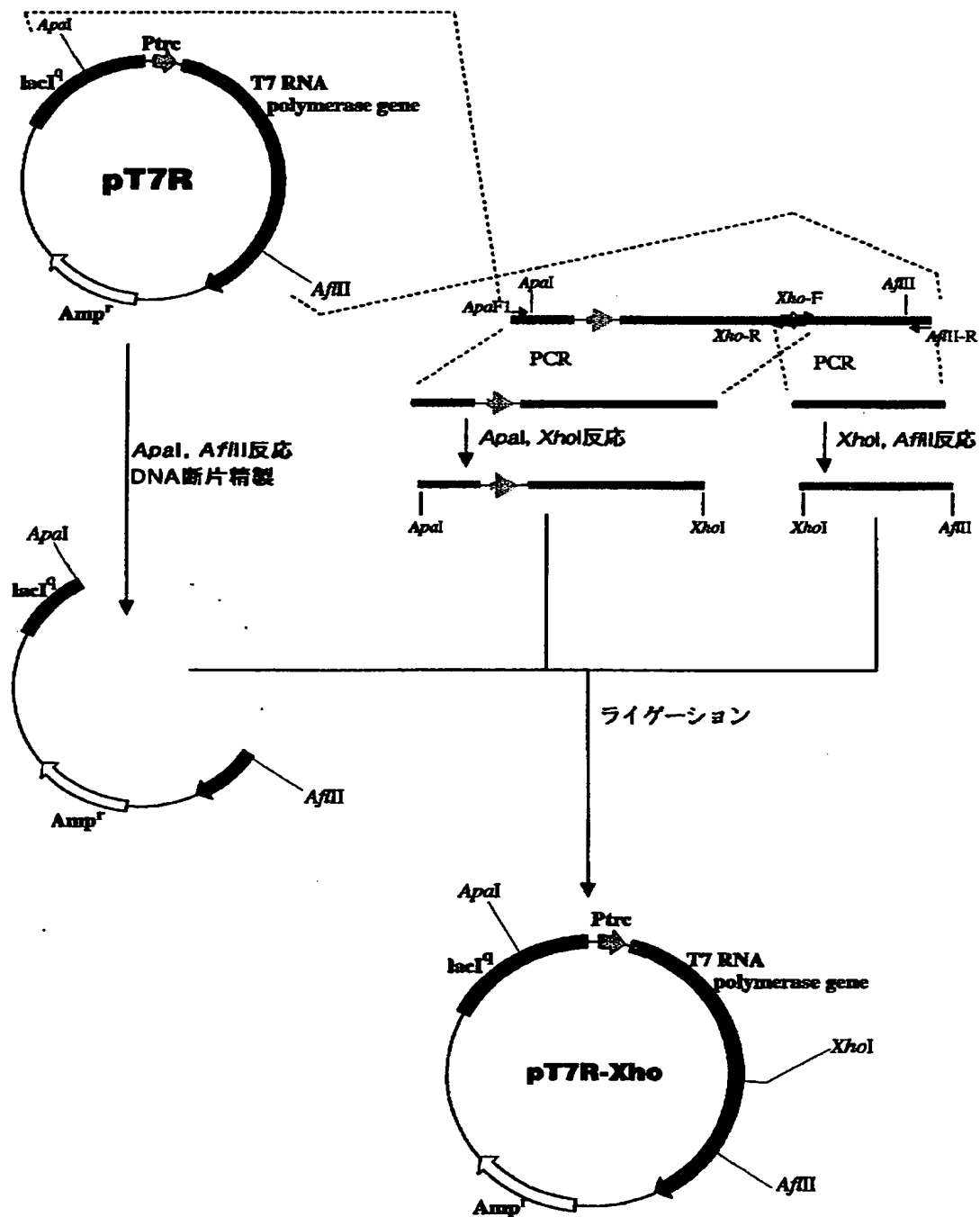
【図9】



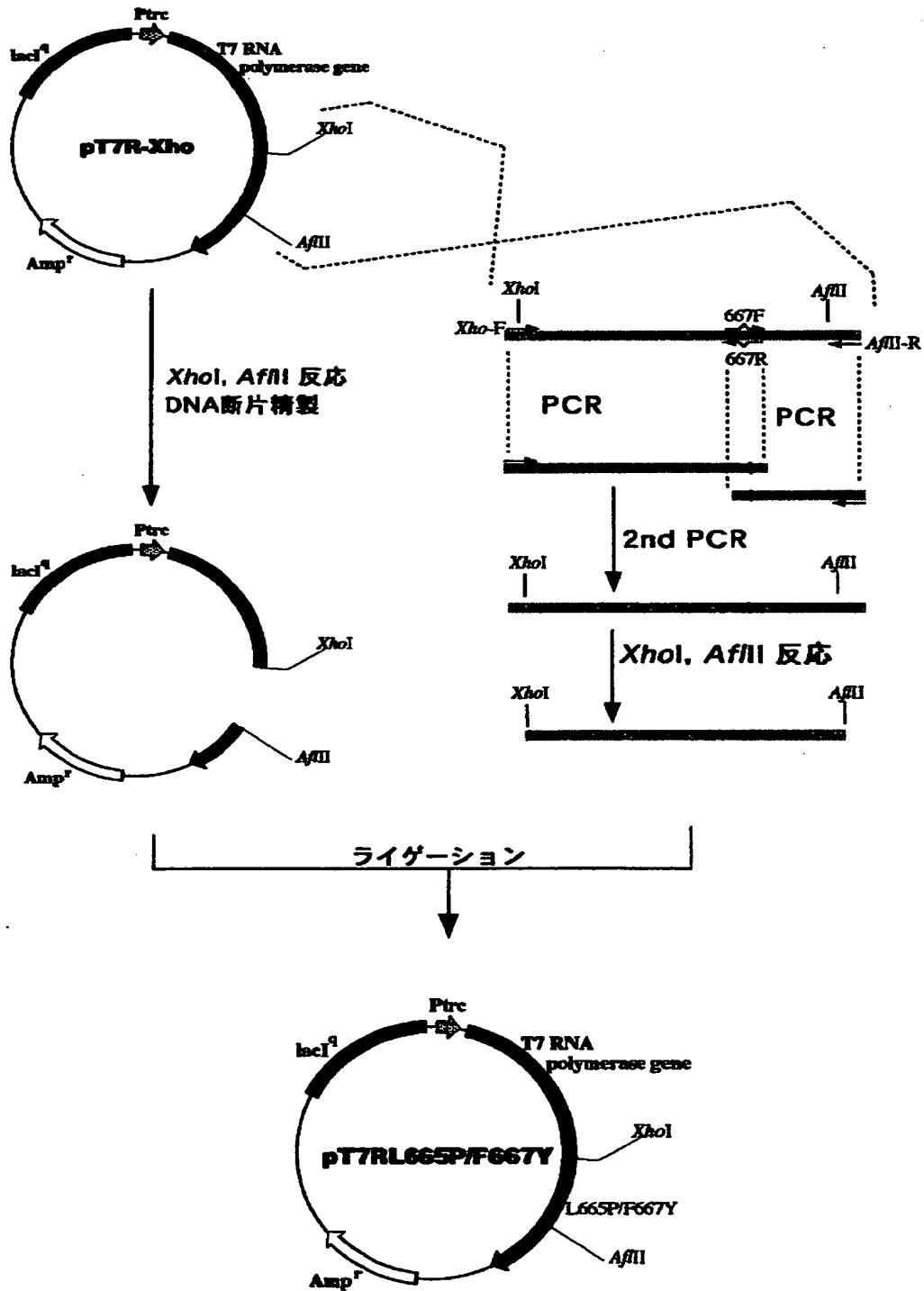
【図10】



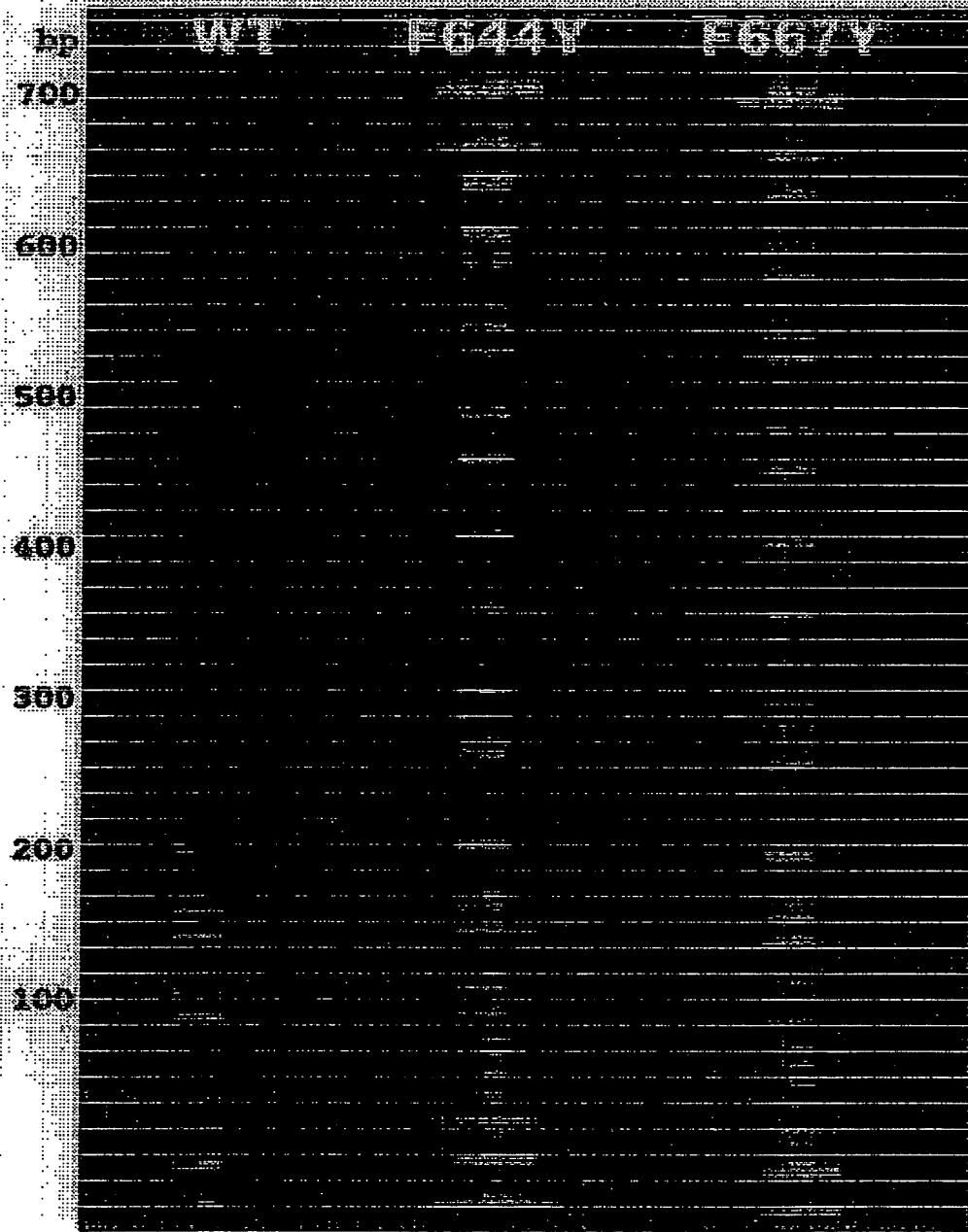
【図11】



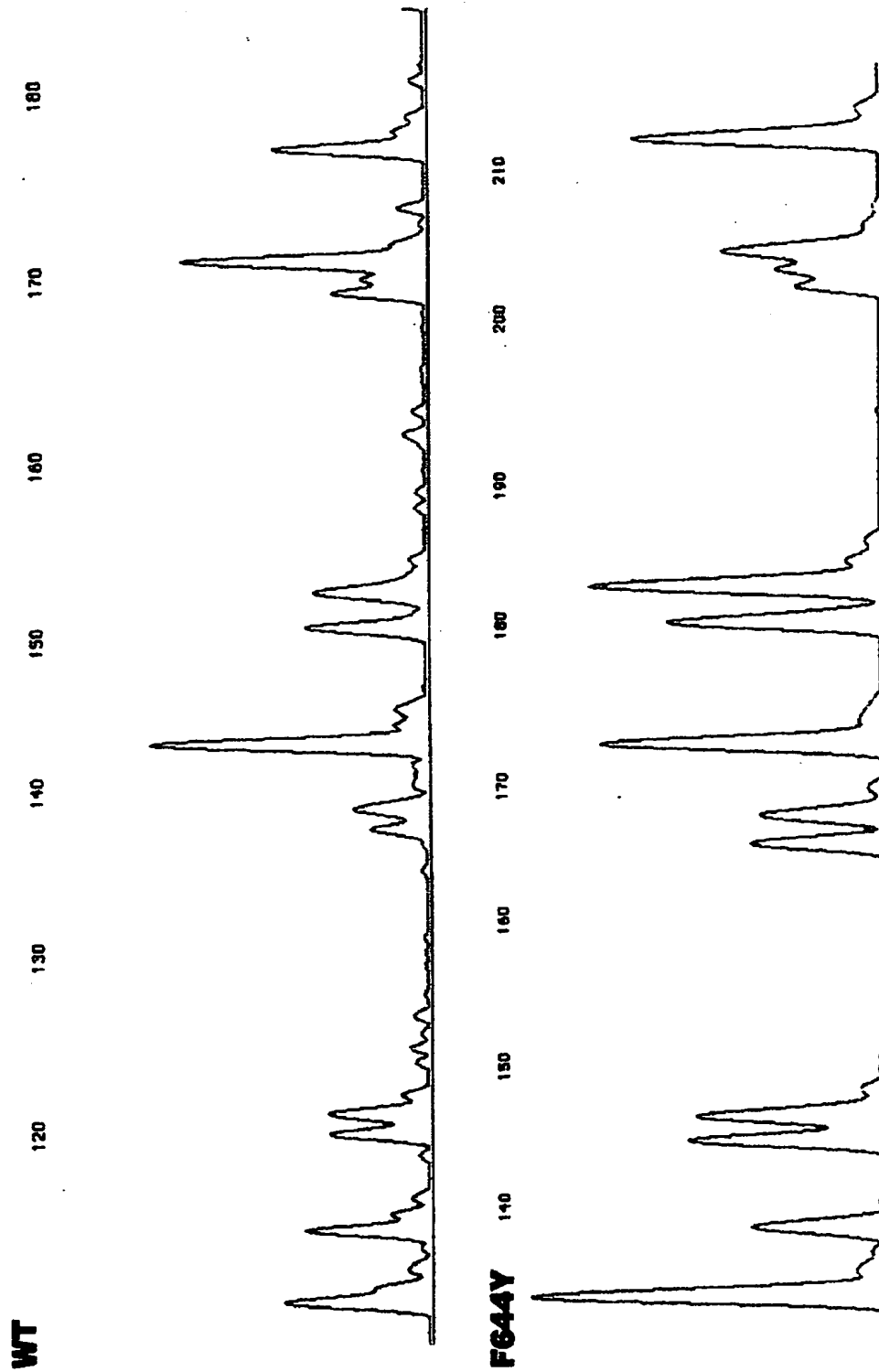
【図12】



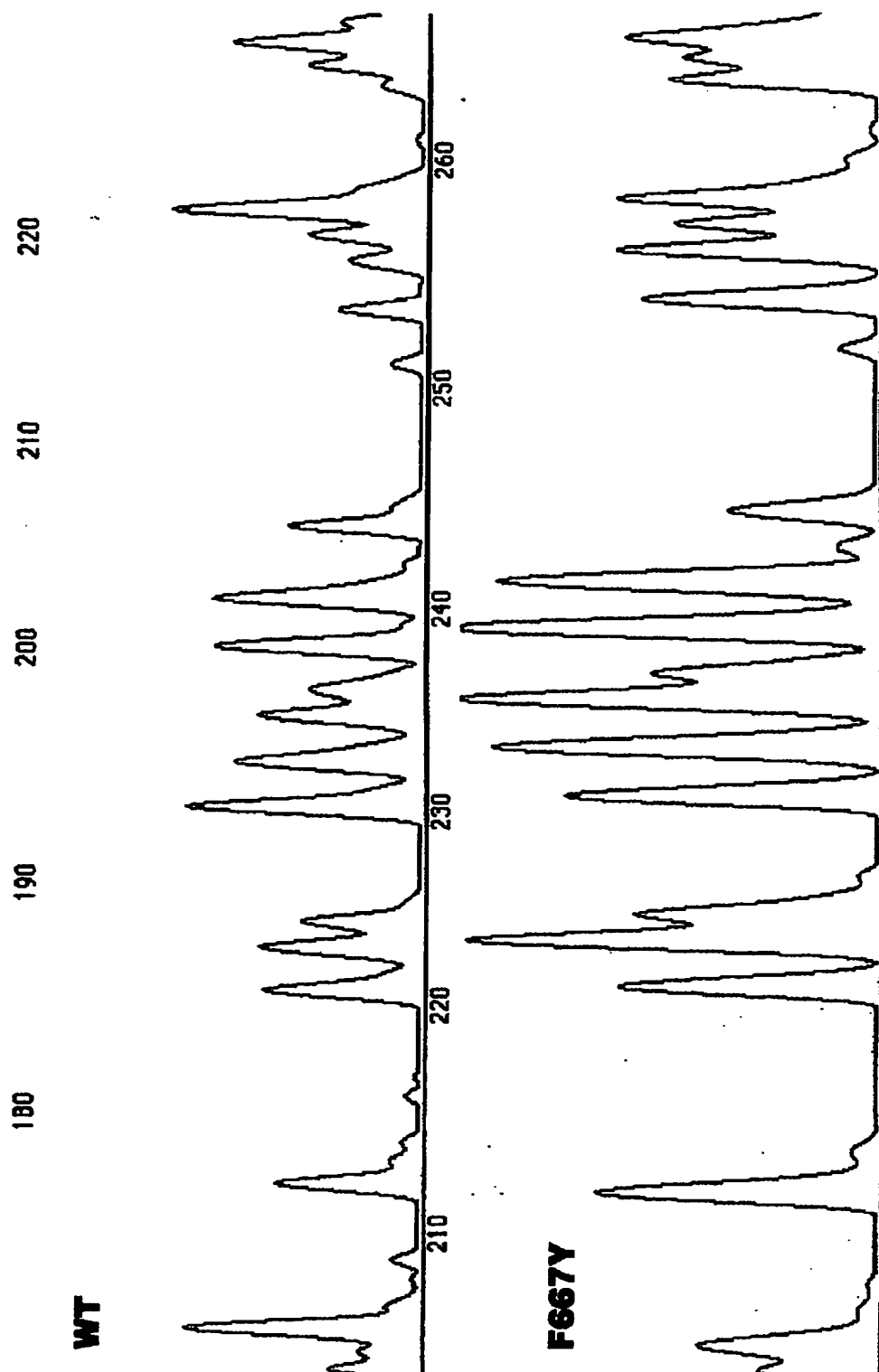
【図13】



【図 1 4】



【図15】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 リボヌクレオチドと3-デオキシリボヌクレオチドとの間、並びに異なる塩基を有するリボヌクレオチド間及び異なる塩基を有するデオキシリボヌクレオチド間での取り込みに対するバイアスが少ないか、或いは全くないRNA ポリメラーゼを提供すること。

【解決手段】 対応する野性型RNAポリメラーゼの能力と比較して、3デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させるように、少なくとも1つのアミノ酸が修飾された野性型RNAポリメラーゼからなるRNAポリメラーゼ。例えば、野性型RNAポリメラーゼのヌクレオチド結合部位中に存在する少なくとも1つのアミノ酸、例えば、フェニルアラニンがチロシンに置換されているRNAポリメラーゼ。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000006792
【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号
【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000135162
【住所又は居所】 東京都新宿区若葉1丁目4番地 金剛ビル
【氏名又は名称】 株式会社ニッポンジーン

【代理人】

申請人

【識別番号】 100092635
【住所又は居所】 東京都中央区八重洲1丁目8-12 藤和八重洲一丁目ビル7F
【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100096219
【住所又は居所】 東京都中央区八重洲1丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階
【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843
【住所又は居所】 東京都中央区八重洲一丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階
【氏名又は名称】 釜田 淳爾

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所

特平 9-180883

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000135162]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都新宿区若葉1丁目4番地 金剛ビル

氏 名 株式会社ニッポンジーン